

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig)

**Untersuchungen zum Nachweis
kollagenolytischer und gelatinolytischer Aktivität
und deren Verteilung im Wurzeldentin
endodontisch behandelter Zähne**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Steffen Müller

geb. am: 23.02.1966 in Treuenbrietzen

Tag der Präsentation:

Dekan:

Prof. Dr. Michael Menger

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Hannig

2. Berichterstatter:

Meiner Mutter

Helga, Else, Hedwig Müller

für die immer fortwährende Unterstützung und Motivation

„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“

Aristoteles (384 v. Chr. – 322 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	English Summary	3
2	EINLEITUNG / LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	Einführung in die Thematik	5
2.2	Matrix-Metalloproteinasen – Allgemeine Grundlagen.....	5
2.2.1	Struktur und Aufbau	6
2.2.2	Aktivierung und Hemmung	10
2.3	Matrix-Metalloproteinasen – Funktionelle und biologische Bedeutung	11
2.3.1	Bedeutung von MMP's für parodontale Erkrankungen	12
2.3.2	Bedeutung der MMP's im dentalen Hartgewebe	14
2.3.2.1	Aufbau, Struktur und Bildung des Dentins	14
2.3.2.2	Erkenntnisse über die MMP's im Dentin	16
2.3.3	Bedeutung und Funktion bei Karies und Sklerosierung	17
2.3.4	Bedeutung und Funktion in der adhäsiven Zahnheilkunde	18
2.4	Kollagenasen und Gelatinasen	19
2.4.1	Spezifität der Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13)	20
2.4.2	Spezifität der Gelatinasen (MMP-2 und -9).....	21
2.4.3	Nachweismethoden von Kollagenasen und Gelatinasen	21
2.5	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	22
3	MATERIAL UND METHODE.....	24
3.1	Material	24
3.1.1	Auswahl und Kriterien an das Untersuchungsmaterial	24
3.1.2	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	25
3.1.3	Vorbereitung des Untersuchungsmaterials.....	25
3.1.4	Gewinnung der Einzelproben	27
3.1.4.1	Einzelproben für die enzymatische Testung am Dentin-Hartmaterial	27

3.1.4.2	Einzelproben für die Testung der Lagerungsmedien.....	28
3.1.5	Lagerung und Beschriftung der gewonnenen Einzelproben	29
3.1.5.1	Lagerung der Einzelproben für die enzymatischen Testungen.....	29
3.1.5.2	Lagerung der Proben für die Untersuchungen der unterschiedlichen Lagerungsmedien.....	29
3.1.6	Verwendete Geräte, Instrumente und Lösungen	29
3.2	Methode	30
3.2.1	Enzymatische Aktivitätsmessung: Prinzip der EnzChek®-Methodik	30
3.2.2	Prinzip der Fluoreszenzmessung	31
3.3	Versuchsplanung und Durchführung	32
3.3.1	Versuchsplanungen für die Enzymaktivitätsmessungen	32
3.3.2	Versuchsplanungen für die Testung der Lagerungsmedien.....	33
3.3.3	Labortechnische Durchführung der EnzChek®-Methode.....	34
3.3.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität pro Dentinanteil	36
3.3.5	Einstellungen und Festlegungen der Standard-Kurven	36
3.4	Statistische Auswertung der Versuche	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Standard-Kurven	39
4.1.1	Konzentrationsbereich der Standard-Kurven.....	39
4.1.2	Trendlinien und R ² -Wert der Standard-Kurven	39
4.1.3	Standard-Kurven für die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte ..	39
4.2	Untersuchung der endodontisch behandelten Zähne (UG 1)	41
4.2.1	Gewicht der Proben (UG 1).....	41
4.2.2	Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 1).....	42
4.2.3	Vergleich der Schnittebenen: UG 1 (endodontisch behandelten Zähne) ...	44
4.3	Untersuchung der nicht endodontisch behandelten Zähne (UG 2).....	45
4.3.1	Gewicht der Proben (UG 2).....	45
4.3.2	Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 2).....	46

4.3.3	Vergleich der Schnittebenen: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne)	47
4.4	Untersuchung der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne (UG 3)	48
4.4.1	Gewicht der Proben (UG 3)	49
4.4.2	Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 3)	50
4.4.3	Vergleich der Schnittebenen: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne)	51
4.5	Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3)	52
4.5.1	Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der koronalen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)	54
4.5.2	Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der medialen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)	55
4.5.3	Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der apikalen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)	55
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse (UG 1, UG 2 und UG 3)	56
4.7	Enzymatische Aktivität und Lagerungsmedien	57
4.7.1	Gewicht der Proben (Testung Lagerungsmedien)	58
4.7.2	Fluoreszenz und enzymatische Aktivitätswerte (Testung der unterschiedlichen Lagerungsmedien)	58
4.7.3	Vergleich der Lagerungsmedien bei gelagerten Dentin-Scheiben: Versuchsansatz 1	60
4.7.4	Vergleich der Lagerungsmedien bei gelagerten kompletten Zähnen: Versuchsansatz 2	61
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der Lagerungsmedien	62
5	DISKUSSION	63
5.1	Diskussion Material und Methoden	63
5.1.1	Auswahl und Herkunft der Dentinproben	63
5.1.2	Lagerung der Zähne und Proben – Substanzen	64
5.1.3	Dentin-Hartmaterial versus Dentinpool	64
5.1.4	Enzymatische Aktivitätsmessung - EnzChek®	65

5.1.4.1	Substrat.....	66
5.1.4.2	Entmineralisierung.....	67
5.1.4.3	Eigenfluoreszenz.....	68
5.1.4.4	Substanzen und Reaktions-Lösungen	69
5.1.4.5	Inkubation und Mess-Zeitpunkte.....	70
5.2	Diskussion der einzelnen Ergebnisse - Vergleich mit der Literatur.....	71
5.2.1	Diskussion über unterschiedliche Lagerungsmedien.....	72
5.2.1.1	Lagerungsmedium Wasser.....	75
5.2.1.2	Lagerungsmedium Frost (tiefgefroren bei -28°C).....	76
5.2.1.3	Lagerungsmedium 70%iger Alkohol	77
5.2.1.4	Lagerungsmedium 0,1%ige und 1%ige Thymollösung.....	78
5.2.1.5	Schlussfolgerungen Lagerungsmedium.....	80
5.2.2	Diskussion: UG 1 (endodontisch behandelten Zähne).....	80
5.2.2.1	Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 1.....	82
5.2.3	Diskussion: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne)	84
5.2.3.1	Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 2.....	85
5.2.4	Diskussion: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne)	86
5.2.4.1	Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 3.....	88
5.2.5	Diskussion: Vergleich der einzelnen Gruppen (UG 1, UG 2, UG 3)	88
5.3	Schlussfolgerungen / Konklusionen	90
6	LITERATUR	94
7	PUBLIKATIONEN / DANKSAGUNG	104
7.1	Publikationen.....	104
7.2	Danksagung	104
8	ANHANG.....	105
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	105
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	105
8.3	Tabellenverzeichnis.....	108

8.4	Anhänge: zusätzliche Tabellen und Graphiken.....	111
8.4.1	Anhang Gliederungspunkt 4.1.2.....	111
8.4.2	Anhang Gliederungspunkt 4.2.2.....	112
8.4.3	Anhang Gliederungspunkt 4.3.2.....	113
8.4.4	Anhang Gliederungspunkt 4.4.2.....	114
8.4.5	Anhang Gliederungspunkt 4.7.2.....	115

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Proteine sind eine Stoffklasse, die in vielfältigster Weise am Aufbau aller bekannten Lebensformen beteiligt ist. Aufgrund ihrer Struktur, die neben den Aminosäuren auch verschiedenste prosthetische Gruppen enthalten kann, werden sie z.B. in Glykoproteine, Nukleoproteine, Lipoproteine und Metalloproteine eingeteilt. Entsprechend dieses Aufbaues sind sie an den unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen und somit an der Regulation von Stoffwechselvorgängen beteiligt, die sich intra- und auch extrazellulär abspielen können. Bei den Metalloproteinen können z.B. Kupfer, Eisen oder Zink im Proteinkomplex verankert werden. Vertreter der vorwiegend extrazellulär wirkenden Proteine sind z.B. die Matrix Metalloproteinasen (MMP). MMP's gehören zur großen Familie von Kalzium-abhängigen, zinkhaltigen Endopeptidasen. MMP's wirken als proteolytische Enzyme und sind am Aufbau bzw. der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix und bei Um- und Abbauprozessen in der oralen Umgebung einschließlich den dentalen Hartgeweben beteiligt.

Man vermutet dabei, dass die gebildeten und sezernierten MMP's neben der degradierenden Rolle auch eine wichtige Funktion beim physiologischen Entwicklungsmechanismus der Bildung der Zahnhartsubstanzen spielen.

Die Lokalisation der MMP's nach der abgeschlossenen Zahnentwicklung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet jedoch, dass sie sich als inaktive Vorstufen im Dentin befinden.

In der vorliegenden Studie wurden Dentin-Scheiben aus dem Wurzel-dentin mit Hilfe eines *Gelatinase / Collagenase Assays* auf das Vorhandensein einer unspezifischen enzymatischen Aktivität durch MMP's getestet. Grundlegend stellte sich die Frage, ob und in welchem Maße sich die im Kollagen-Matrix-Bereich des Wurzel-Dentins befindlichen MMP's herauslösen, aktivieren und nachweisen lassen.

Der Literaturstudie zufolge sind momentan nur Studien beschrieben, die sich mit der kollagenolytischen und gelatinolytischen Aktivitätstestung am pulverisierten Dentin beschäftigen, jedoch keine, die sich mit einer Testung enzymatischer Aktivität am Dentin-Hartmaterial näher auseinandersetzen.

Für die Testreihen in dieser Studie wurde Dentin-Hartmaterial aus dem Wurzelbereich von: 1. endodontisch behandelten Zähnen, 2. nicht endodontisch behandelten Zähnen und 3. noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen verwendet. Jeder Untersuchungsgruppe wurden jeweils 10 Zähne zugeordnet. Die eigentliche Enzymtestung auf eine unspezifische

enzymatische Aktivität fand an einzelnen Dentin-Scheiben statt, die aus dem koronalen, medialen und apikalen Anteil der Zahnwurzel geschnitten wurden. Insgesamt wurden so 90 Dentin-Scheiben, also 30 Dentin-Scheiben pro Schnittebene und Untersuchungsgruppe getestet. Dabei galt es die **Hypothese** zu testen, dass es im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne eine enzymatische Aktivität durch das Vorhandensein von MMP's gibt. Die **Null-Hypothese** dagegen lautet, dass sich keine Unterschiede der MMP-Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch und nicht endodontisch behandelter Zähne nachweisen lassen.

In einem Teilversuch dieser Arbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher Lagerungsmedien auf die zu lagernden Zähne und Zahnbestandteile bzw. auf die zu untersuchende enzymatische Aktivität beleuchtet werden. Als Lagerungsmedium wurden normales Leitungswasser (H₂O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige und 1%ige Thymollösung verwendet. Als weiteres Lagerungsverfahren wurde eine Tiefkühlung der Präparate bei -28°C getestet.

Aus den Ergebnissen der Enzymtestung der einzelnen Gruppen dieser Studie, kann man zusammenfassen, dass sich eine unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische enzymatische Aktivität im Wurzel-Dentin an allen Dentin-Scheiben nachweisen ließ. Eine enzymatische Testung am Dentin-Hartmaterial ist somit möglich und liefert verwertbare Ergebnisse. Innerhalb des Wurzel-Dentins von koronal nach apikal ließen sich Verteilungsmuster der durch die MMP's hervorgerufenen enzymatischen Aktivität nachweisen. In allen Untersuchungsgruppen konnte eine von koronal nach apikal ansteigende enzymatische Aktivität festgestellt werden, wobei diese Unterschiede statistisch signifikant waren. Betrachtet man wieder das gesamte Wurzel-Dentin, so war die MMP-Aktivität jeweils in den noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen und bei den endodontisch behandelten Zähnen fast gleich, aber höher als bei den nicht endodontisch behandelten Zähnen. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Keines der Lagerungsmedien beeinflusste die enzymatische Aktivität, sodass sowohl 0,1%ige Thymollösung, eine Tiefkühlung der Präparate bei -28°C und eine Lagerung in 70%igem Alkohol in Erwägung gezogen werden können.

Die Aktivierbarkeit von MMP's, die seit ihrer Synthetisierung und Sezernierung in die mineralisierte Dentin-Matrix bei der Dentinogenese eingeschlossen waren, zeigt die außerordentliche Stabilität und Langlebigkeit dieser Enzyme.

Durch die mit dieser Studie erzielten Ergebnisse kann die aufgestellte **Hypothese** nicht vollständig bestätigt und angenommen werden. Die **Null-Hypothese** bleibt bestehen, da keine Unterschiede der enzymatischen Aktivität des Wurzel-Dentins zwischen endodontisch und nicht endodontisch behandelten Zähnen nachgewiesen werden.

1.2 English Summary

Proteins are a class of substances that are involved in various ways in the formation of all known forms of life. Based on their structure which, besides amino acids, may include a multitude of prosthetic groups, they are classified, for example, into glycoproteins, nucleoproteins, lipoproteins and metalloproteins. Based on this composition, they play a part in a large number of different physiological and pathophysiological processes and thus in the regulation of the intracellular as well as extracellular metabolism. In metalloproteins, for instance, copper, iron or zinc may be incorporated in the protein complex. Examples of proteins with a predominantly extracellular effect are, e. g., the matrix metalloproteinases (MMP). MMPs belong to the large family of calcium-dependent zinc-containing endopeptidases. MMPs act as proteolytic enzymes and are involved in the formation and/or degradation of proteins of the extracellular matrix and in remodeling and degradation processes in the oral environment including the dental hard tissues.

It is assumed that, in addition to their degrading effect, the secreted MMPs have an important function in the physiological development mechanism of dental hard substance formation.

The localization of the MMPs after the completed development of the teeth, however, has not yet been fully clarified. It has been suggested that they are located in the dentin as inactive precursors.

In the present study, dentin slices from root dentin were tested by means of a *gelatinase / collagenase assay* for the presence of an unspecific enzymatic activity prompted by MMPs. The basic question was how and to what extent the MMPs in the collagen matrix of the root dentin can be isolated, activated and detected.

According to our literature review, the only studies currently to be found are dealing with collagenolytic and gelatinolytic activity testing in pulverized dentin, but there are no studies describing in detail any testing for the enzymatic activity in dentin hard substance.

For the series of tests made in our study, dentin hard substance was used taken from root area of: 1. teeth treated endodontically, 2. teeth not treated endodontically, and 3. teeth not yet exposed in the oral cavity. Ten teeth were assigned to each experimental group. The actual enzyme tests for an unspecific enzymatic activity were made with individual dentin slices cut from the coronal, mesial and apical section of the dental root. In all, 90 dentin slices, i.e. 30 dentin slices per test group and cutting plane, were tested. The purpose was to test the **hypothesis** that in the root dentin of endodontically treated teeth there is enzymatic activity resulting from the presence of MMPs, whereas the **null hypothesis** reads that no difference in the MMP activity of the root dentin of endodontically treated and not endodontically treated teeth can be detected.

In another experiment which was part of our study, we wanted to take a closer look at the effect

of different storage media on the teeth and components of teeth to be stored and the enzymatic activity to be examined. The storage media used were normal tap water (H₂O), 70% ethanol solution, 0.1% and 1% thymol solution. An additional storage method was deep-freezing of the test specimens at -28°C. In summary, according to the enzyme testing results of the experimental groups of our study, an unspecific gelatinolytic and collagenolytic enzymatic activity in the root dentin could be detected in all dentin slices. Thus, enzymatic testing of the dentin hard substance is possible and will produce usable results. Inside the root dentin, distribution patterns of enzymatic activity from coronal to apical caused by MMPs could be identified. In all test groups an enzymatic activity increasing from coronal to apical was found and was statistically significant. If we again look at the root dentin as a whole, the MMP activity was almost the same in teeth not yet exposed in the oral cavity and endodontically treated teeth, and was higher in both these groups than in the teeth not endodontically treated. These differences, however, were not statistically significant. The experiments for determining the influence of the storage media on the enzymatic activity did not produce any statistically significant differences. But as a recommendation for storing teeth and parts of teeth it turned out that 0.1% thymol solution is not unfavorable. Deep-freezing of the test specimens at -28°C and storage in 70% alcohol could be considered as alternatives. The fact that MMPs which since their synthesis and secretion had been enclosed in the mineralized dentin matrix during dentinogenesis can be activated shows the extraordinary stability and longevity of these enzymes.

In view of the results of the present study, the **hypothesis** formulated cannot be fully confirmed and accepted. Basically, the **null hypothesis** remains valid. Although we did find a trend towards differences in the enzymatic activity of the root dentin of endodontically treated and not endodontically treated teeth, these differences could not be shown to be statistically significant.

2 Einleitung / Literaturübersicht

2.1 Einführung in die Thematik

Proteine sind die am Aufbau des Lebens am häufigsten beteiligte Stoffklasse. Proteine bestehen im Wesentlichen aus einzelnen Aminosäuren. Aminosäuren besitzen als reaktive chemische Gruppen jeweils eine Amino- und eine Carboxygruppe. Verbinden sich einzelne Aminosäuren, das heißt, verbindet sich die Carboxylgruppe der einen Aminosäure mit der Aminogruppe der anderen Aminosäure entsteht durch eine Säureamid-Bindung ein (Di)-Peptid. Die Verbindung mehrerer Peptide untereinander zu einer langen Peptidkette bezeichnet man als (Poly)-Peptid. Den Zusammenschluss mehrerer Polypeptidketten bezeichnet man als Protein. Proteine sind durch eine Primärstruktur (Sequenz der einzelnen Aminosäuren), eine Sekundärstruktur (durch H-Brücken untereinander stabilisierte Bereiche „Faltblattstruktur“) und durch eine Tertiärstruktur (räumliche Anordnung durch alle vorhandenen chemischen Bindungen) gekennzeichnet.

Viele Proteine enthalten zusätzlich einen nicht aus Aminosäuren bestehenden Bestandteil als prosthetische Gruppe. Als prosthetische Gruppe können Kohlenhydrate (Glykoproteine), Nukleinsäuren (Nukleoproteine), Lipide (Lipoproteine) und Metalle (Metalloproteine) fungieren. Bei den Metalloproteinen können Kupfer, Eisen oder Zink im Proteinkomplex verankert werden. Die entsprechenden Metallionen fungieren als funktioneller Bestandteil der entsprechenden Metalloenzyme (*Buddecke, 1985; Koolmann, 1994*).

2.2 Matrix-Metalloproteinasen – Allgemeine Grundlagen

Matrix Metalloproteinasen (MMP's) sind Vertreter der großen Familie von Kalzium-abhängigen, zinkhaltigen Endopeptidasen (*Bode et al., 1999; Sternlicht et al., 2000; Vu und Werb, 2000; Manello et al., 2006; Verma und Hansch, 2007; Amălinei et al., 2007*). Sie entfalten ihre physiologische und pathologische Rolle vorwiegend in der extrazellulären Matrix (ECM) (*Hannas et al., 2007; Amălinei et al., 2007*) und bei Um- und Abbauprozessen in der oralen Umgebung (*Chaussain-Miller et al., 2006*). MMP's spielen weiterhin eine Schlüsselrolle in der normalen Physiologie des Bindegewebes, also während der Entwicklung, der Morphogenese und der Wundheilung (*Brew et al., 2000*). Ihre unregulierte Aktivität wird mit zahlreichen Krankheitsprozessen wie z.B. Arthritis, Metastasierung von Geweben durch Tumorzellen, Atherosklerose (*Brew et al., 2000*), kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephritis, neurologische Krankheiten, Ausfall der Blut-Hirn-Schranke, Haut- und Magengeschwürbildungen, Leberfibrose, Lungenemphysem und nicht zuletzt periodontalen Erkrankung (*Nagase et al., 1999*) in Verbindung gebracht.

Schon seit einiger Zeit wird auch eine Beteiligung der MMP's an der Ausbreitung von kariösen

Läsionen diskutiert (Sorsa et al., 2004).

Körporgewebe, wie z.B. Epithel-, Binde-, Muskel- und Nervengewebe bestehen aus verschiedenen Zellen und dem extrazellulären Raum, welcher wiederum aus einem komplexen Makromolekülgeflecht, der extrazellulären Matrix besteht (Hamacher et al., 2004).

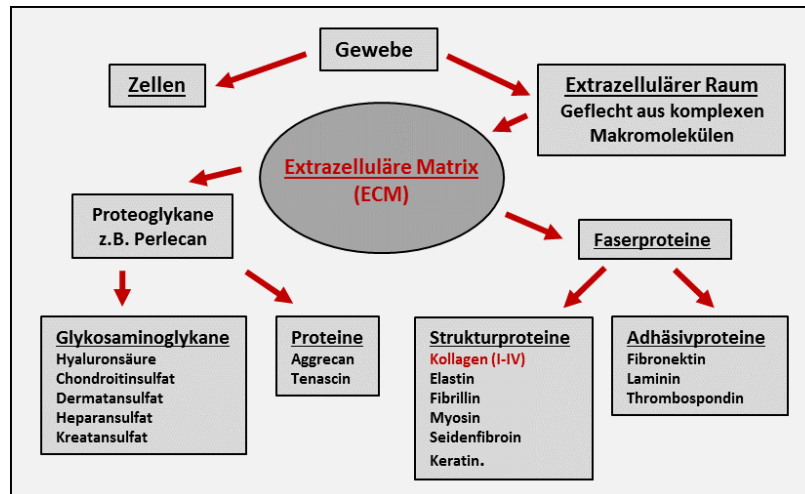


Abbildung 1: Übersicht der Klassifizierung der Makromoleküle der extrazellulären Matrix (ECM), Abbildung modifiziert nach Hamacher et al., 2004

MMP's werden durch eine Vielzahl von Bindegewebe- und proinflammatorischen Zellen, einschließlich Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten (Chaussain-Miller et al., 2006) sowie Endothelzellen, Makrophagen und neutrophilen Lymphozyten sezerniert (Verma und Hansch, 2007). Sie sind zudem eine Gruppe von strukturell verwandten Enzymen verschiedenen genetischen Ursprungs, die zusammen für den Abbau vieler extrazellulärer Matrix-Proteine der ECM und Komponenten der Basalmembranen verantwortlich sind (Sorsa et al., 2004).

Gross und Lapiere berichteten 1962 erstmals über MMP's im Zusammenhang mit einer kollagenolytischen Aktivität im Rahmen ihrer Studien der Entwicklung von Kaulquappen (Gross und Lapiere, 1962).

2.2.1 Struktur und Aufbau

Die enzymatischen Funktionen der einzelnen MMP's liegen in ihrem Aufbau begründet. Alle MMP's weisen im Wesentlichen einheitliche strukturelle Komponenten auf. Diejenigen Komponenten, die die unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen und Funktionsweisen begründen, variieren jedoch zwischen den einzelnen Vertretern. Die Abbildung 2 und die Tabelle 1 vermittelt darüber einen Überblick. Dieser strukturelle Aufbau der MMP's war seit den 90er Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten, da man aus dem strukturellen Aufbau auf die Funktion und die Wirkungsweise der MMP's schießen wollte (Woessner, 1991; Birkedal-Hansen et al., 1993; Bode et al., 1999; Visse und Nagase, 2003).

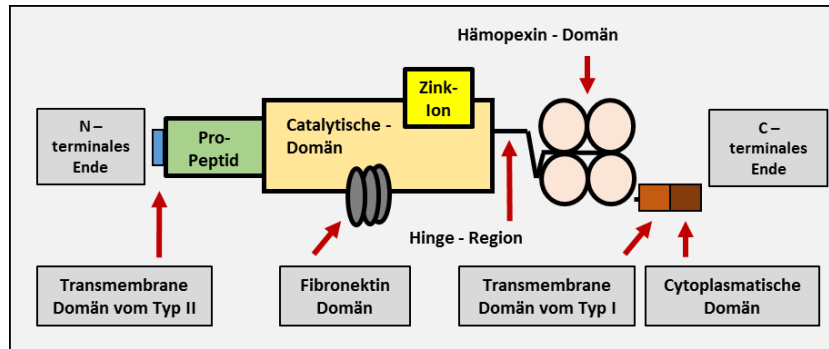


Abbildung 2: Grundsätzliche strukturelle Domänenstruktur der MMP's, Abbildung modifiziert nach Visse und Nagase, 2003 und Chaussain-Miller et al., 2006

Momentan sind 28 MMP's klassifiziert (Visse und Nagase, 2003). In der Tabelle 1 ist eine Übersicht über die differenzierte Struktur der einzelnen MMP's aufgeführt.

Tabelle 1: Differenzierte Domänenstruktur einzelner MMP's, Tabelle modifiziert nach Visse und Nagase, 2003 und Chaussain-Miller et al., 2006

MMP	Pro-Peptid	Catalytische Domäne	Hämoexin ähnliche Domäne	Hinge-Region	Transmembran Domäne	Cytoplasmatische Domäne
7, 26	x	x		x		
1, 3, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 27	x	x	x	x		
2,9,	x	x	x	x		
21	x	x	x	x		
11,28	x	x	x	x		
14, 15, 16, 24	x	x	x	x	x Typ I	
17,25	x	x	x	x		
23	x	x		x	x Typ II	x
x bedeutet: strukturelle Region vorhanden						

Grundsätzlich bestehen MMP's aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Domäne, einer Hinge-Region und einer hämoexin-ähnlichen Region (Nagase und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003; Hamacher et al., 2004; Maskos, 2005; Nagase et al., 2006; Verma und Hansch, 2007).

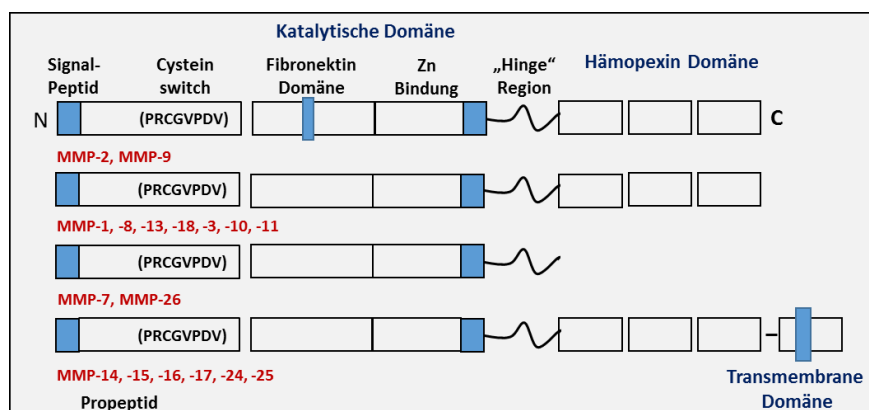


Abbildung 3: Strukturelle Anordnung der verschiedenen Domänen der verschiedenen MMP's, Abbildung modifiziert nach Hamacher et al., 2004

Das Signalpeptid (Abb. 2/3) am N-terminalen Ende des Enzyms besteht ungefähr aus 17 bis

20 hydrophoben Aminosäuren (*Hamacher et al., 2004; Maskos, 2005*) und ist verantwortlich für die Sekretion des Enzyms in das endoplasmatische Retikulum, von dem sie dann an die ECM abgegeben werden (*Visse und Nagase, 2003*).

Das Propeptid (Abb. 2/3) besteht aus 80 Aminosäuren. N-terminal befindet sich ein hydrophober Rest, während sich am C-terminalen Ende eine hochkonservierte Region der sogenannte „Cystein-Switch“ befindet (*Hamacher et al., 2004; Nagase et al., 2006*). Zusammen mit der zinkbindenden-Region in der katalytischen Domäne ist der „Cystein-Switch“ (siehe 2.2.2.) eine wichtige strukturelle Signatur, über welche Pro-MMP's über die Verhinderung der Bindung eines Wassermoleküls am katalytischen Zink-Ion im inaktiven Zustand gehalten werden können (*Nagase et al., 2006; Mannello et al., 2006*).

Die katalytische Domäne (Abb. 2/3) besteht aus ca. 160 bis 170 Aminosäuren und beinhaltet die katalytische Zink-Region (*Hamacher et al., 2004; Nagase und Woessner, 1999; Nagase et al., 2006*). Beidseits der katalytischen Zinkregion haben die MMP's ein weiteres Zink-Ion, das strukturelle Zink, an dem jeweils zwei bis drei Calcium-Ionen gebunden sind bzw. gebunden werden können (*Bode et al., 1999; Maskos, 2005*). Diese Region ist wichtig für die enzymatische Aktivität der einzelnen MMP's.

Die Hämapexin-ähnliche Domäne (Abb. 2/3) besteht aus ungefähr 200 Aminosäuren (*Nagase und Woessner, 1999; Nagase et al., 2006*). Diese Region scheint für die Substratspezifität der einzelnen MMP's verantwortlich zu sein und gleichfalls vermutet man aber, dass diese Region auch in die Aktivierung der MMP's involviert sein könnte (*Bode et al., 1999*).

Die Verbindung zwischen der katalytischen Domäne und der Hämapexin-ähnlichen Domäne wird durch die Hinge-Region (Abb. 2/3) hergestellt (*Hamacher et al., 2004*). Ihr wird eine entscheidende Bedeutung bei der Stabilität des Enzyms zugeschrieben (*Maskos, 2005*).

MMP's werden entsprechend ihrer Substratspezifität klassifiziert und in verschiedene Gruppen eingeteilt. So werden Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Transmembran MMP's und nicht weiter klassifizierte MMP's unterschieden (*Vu und Werb, 2000; Lynch und Matrisian, 2002; Visse und Nagase, 2003; Bode et al., 2003; Chaussain-Miller et al., 2006; Verma und Hansch, 2007*).

Eine Einteilung der entsprechenden MMP's und ihrer Substrate ist in Tabelle 2 dargestellt. Die MMP's-4, -5 und -6 sind nicht näher bezeichnet. MMP's sind auch in der Lage neben den in Tabelle 2 bezeichneten Substraten der ECM, eine Vielzahl von Nicht-Matrix-Substraten, wie z.B. Perlecan, Plasminogen, α 1-Anti-Chymotripsin und α 2-Makroglobulin zu verarbeiten (*Lynch und Matrisian, 2002*).

In der Regel liegen die MMP's nach ihrer Sekretion in die ECM in einer inaktiven Vorstufe, den Pro-MMP's oder sogenannten zymogenen Formen vor (*Vu und Werb, 2000; Visse und Nagase, 2003; Sorsa et al., 2004; Chaussain-Miller et al., 2006*).

Eine Aktivierung der Pro-MMP's und damit eine Überführung in die aktive Form vollzieht sich

durch einen kaskadenförmigen Reaktionsmechanismus, der z.B. durch proteolytische Enzyme, wie Serin-Proteasen, Furin und Plasminogen (*Verma und Hansch, 2007*), chemische Mittel, wie Thiol, oxidiertem Glutathion, reaktive Sauerstoffatome, einen niedrigen pH-Wert oder Wärmebehandlung ausgelöst werden kann (*Visse und Nagase, 2003; Hannas et al., 2007; Amălinei et al., 2007*).

Tabelle 2: Einteilung der Matrix Metalloproteinasen und ihre Substratspezifität, Tabelle modifiziert nach *Lynch und Matrisian, 2002*

MMP	Alternativname	ECM Substrate
MMP-1	Collagenase 1	Collagen I/II/III/VII/X/XI, Gelatin, Entactin, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Tenascin, Vitronectin
MMP-2	Gelatinase A	Collagen I/II/III/VII/X/XI, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Laminin, Aggrecan, Tenascin, Decorin, Vitronectin
MMP-3	Stromelysin-1	Collagen III/IV/V/VII/IX/X/XI, Elastin, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Aggrecan, Entactin, Decorin, Tenascin, Vitronectin
MMP-7	Matrilysin	Collagen I/IV, Aggrecan, Laminin, Fibronectin, Gelatin, Entactin, Decorin, Elastin, Tenascin, Vitronectin
MMP-8	Collagenase-8	Collagen I/II/III, Aggrecan
MMP-9	Gelatinase B	Collagen IV/V/XI/XIV, Decorin, Gelatin, Elastin, Laminin, Aggrecan, Vitronectin
MMP-10	Stromelysin-2	Collagen III/IV/V, Aggrecan, Elastin, Laminin, Fibronectin, Gelatin
MMP-11	Stromelysin-3	ND
MMP-12	Metalloelastase	Collagen I/IV, Aggrecan, Decorin, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Entactin
MMP-13	Collagenase-3	Collagen I/II/III/VI/IX/X/XIV, Gelatin, Fibronectin, Aggrecan
MMP-14	MT1-MMP	Collagen I/II/III, Gelatin, Fibronectin, Laminin, Entactin, Vitronectin, Aggrecan
MMP-15	MT2-MMP	Aggrecan, Entactin, Fibronectin, Laminin, Tenascin
MMP-16	MT3-MMP	Collagen III, Fibronectin, Gelatin
MMP-17	MT4-MMP	Gelatin
MMP-18	Collagenase 4	Collagen I
MMP-19	RASI	Collagen I/IV, Fibronectin, Gelatin, Tenascin, Laminin, Aggrecan, Entactin, COMP
MMP-20	Enamelysin	Collagen XVIII, Aggrecan, Amelogenin, COMP
MMP-21	XMMP	No known substrates
MMP-22	CMMP	Gelatin
MMP-23	CA-MMP	ND - nicht definiert
MMP-24	MT5-MMP	Collagen I, Gelatin, Fibronectin, Laminin
MMP-25	MT6-MMP	Collagen IV, Gelatin, Fibronectin
MMP-26	Matrilysin-2 / Endometase	Collagen IV, Fibronectin, Gelatin
MMP-27		ND - nicht definiert
MMP-28	Epilysin	ND - nicht definiert

MMP's werden als Pre-Pro-Enzyme synthetisiert. Das Signalpeptid, ausschlaggebend für die Synthetisierung, wird während der Übersetzung entfernt und so entsteht die entsprechende Pro-MMP-Form. Das Vorhandensein einer empfindlichen „Köder-Region“ in den Pro-MMP's ermöglicht es Gewebe- und Plasmaproteinase, die Pro-MMP's zu aktivieren (*Nagase et al., 2006*). Dabei stellt die Reaktion mit der „Köder-Region“ nur einen Teil des Aktivierungsmechanismus dar. Den anderen Teil in der sogenannten kaskadenförmigen Aktivierung (*Nagase et al., 2006*) übernehmen dabei MMP-Zwischenstufen oder andere aktive

MMP's (Nagase *et al.*, 2006; Bode *et al.*, 1999; Chaussain-Miller *et al.*, 2006).

2.2.2 Aktivierung und Hemmung

Die Aktivität der MMP's kann auf mehreren Ebenen gesteuert und geregelt werden: 1. auf der Ebene der positiven und negativen Transkription der Pro-MMP's, 2. auf der Ebene der Aktivierung der zymogenen Vorstufen, 3. auf der Ebene der Substratspezifität und 4. auf der Ebene der Hemmung der aktiven Formen durch verschiedene Gewebeinhibitoren der MMP's, den sogenannten (TIMP's) (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Hannas *et al.*, 2007; Amălinei *et al.*, 2007; Verma und Hansch, 2007).

Ein besonderer Aktivierungsmechanismus ist der von MMP-2. Die Aktivierung von MMP-2 erfolgt durch MT1-MMP, ein in der Zellmembran verankertes MMP, welches für die Aktivierung zusätzlich die Bindung von TIMP-2 und Pro-MMP-2 erfordert, wodurch sich letztendlich auch die Lokalisierung der Zymogene von MMP-2 in der Nähe eines benachbarten aktiven MT1-MMP erklären lässt (Chaussain-Miller *et al.*, 2006; Amălinei *et al.*, 2007). Dabei scheint der Komplex zwischen MT1-MMP und TIMP-2 als ein zelloberflächen gebundener Rezeptor zu fungieren (Bode *et al.*, 1999).

Die Aktivierung der MMP's verläuft über Reaktionen an der katalytischen Domäne. Zentrum der katalytischen Domäne ist ein Zink-Atom, gebunden an eine hoch-konservierte Sequenz aus Aminosäuren „HExxHxxGxxH“ in der drei Histidine eingebunden sind (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Woessner, 1991; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Bode *et al.*, 1999). In der Propeptid-Sequenz „PRCGVPD“ befindet sich ein Cystein, welches über eine Bindung zum Zink-Ion die MMP's in ihrer inaktiven oder latenten Form hält (Woessner, 1991; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Bode *et al.*, 1999).

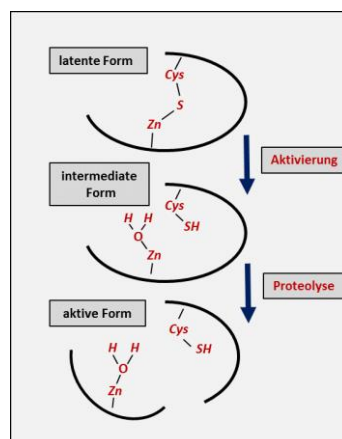


Abbildung 4: Aktivierungsmechanismus der MMP's über den so bezeichneten „Cystein-Switch“, Abbildung modifiziert nach Springman *et al.*, 1990

Die räumliche Anordnung (Faltung) durch die Bindungskräfte dieser Cystein-Zink-Bindung bewirkt eine Blockade des Substratzuganges. Die Aufspaltung der Cystein-Zink-Bindung über

Reaktionen an der sogenannten „Köder-Region“ ermöglicht durch Lösen der Bindung des Zink-Ions zum Cystein die Anlagerung eines Wassermoleküls und somit die Überführung der MMP's in ihre aktive Form (*Springmann et al., 1990; Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990*). Das Bindungsverhalten an der Cystein-Zink-Bindung (Abb. 4) wurde von *Springman* als sogenannter „Cystein-Switch“ bezeichnet

Das degenerative Potential der MMP's wird normalerweise durch endogene Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen, den sogenannten TIMP's (Tissue Inhibitors of MMP) kontrolliert und gesteuert (*Nagase und Woessner, 1999; Brew et al., 2000; Bode et al., 1999; Hamacher et al., 2004; Maskos, 2005*). TIMP's sind zwei Domänen-Moleküle, die aus einer N-terminalen Domäne von ungefähr 125 Aminosäuren und einer kleineren C-terminalen Domäne von 65 Aminosäuren bestehen, in dem die N-terminale Domäne befähigt ist, mit dem entsprechenden MMP ein stabiles Molekül zu bilden, um dieses dann in seiner Aktivität zu hemmen (*Brew et al., 2000; Nagase et al., 2006*). Dabei scheinen die in den jeweiligen Domänen enthaltenden Disulfidbrücken eine wichtige Rolle zu spielen (*Maskos, 2005; Nagase et al., 2006*).

Alle momentan identifizierten TIMP's besitzen eine zu 40% identische Homologie in ihrer Aminosäuresequenz (*Verstappen und von den Hoff, 2006*).

TIMP's interagieren mit der aktiven Form der MMP's indem sie 1:1 Komplexe verminderter enzymatischer Aktivität bilden (*Bode et al., 1999; Visse und Nagase, 2003*). Die inhibitorische Wirkung der TIMP's beruht dabei auf Chelatisierung des katalytischen Zink-Enzyms durch Thiol-, Carboxyl-, Phosphat-, Sulfodiimin-, oder Hydroxamatgruppen (*Hamacher et al., 2004*). So sind die meisten mesenchymalen und epidermalen Zellen in der Lage TIMP's zu synthetisieren (*Verstappen und von den Hoff, 2006*). An der Regulierung der Aktivität von MMP's sind unter anderem auch unspezifische Proteininhibitoren, insbesondere Makroglobulin beteiligt (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Bode et al., 1999*).

Die Homöostase der ECM ist entscheidend, für die Aufrechterhaltung der richtigen Zellfunktionen (*Lynch und Matrisian, 2002*). Die Balance zwischen MMP's und TIMP's, also das Verhältnis zwischen Aktivität und Hemmung, scheint aber trotzdem je nach Gewebe sehr variabel zu sein (*Verstappen und von den Hoff, 2006*). Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen MMP's und ihren TIMP's fördert somit pathologische Prozesse und kann letztendlich zu Krankheiten führen (*Brew et al., 2000*).

2.3 Matrix-Metalloproteinasen – Funktionelle und biologische Bedeutung

Pathologische Prozesse, welche durch eine unkontrollierte Degradation der ECM entstehen, signalisieren ein gestörtes Verhältnis zwischen den MMP's und den TIMP's (*Verstappen und*

von den Hoff, 2006). Das Gleichgewicht zwischen MMP's und TIMP's spielt also eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des gesunden Gewebes, wobei aber die systemische Konzentration von MMP's und TIMP's eine etwas untergeordnete Rolle zu spielen scheint, da das lokale Gleichgewicht dieser Proteine den Matrixauf- und abbau zu bestimmen scheint (*Verstappen von den Hoff, 2006*). MMP's können heute aber nicht mehr nur als reine ECM Zerstörer gesehen werden, denn vielmehr sind sie als Teil eines eleganten Kommunikationssystems, in welchem Zellen und ECM miteinander und untereinander agieren, zu sehen (*Lynch und Matrisian, 2002*). So sind MMP's in grundlegende zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Migration, Morphogenese und Apoptose involviert (*Vu und Werb, 2000; Manello et al., 2006*). Ihre proteolytische Aktivität entfalten sie bei physiologischen Prozessen, wie Wachstum und Knochenentwicklung, bei der kardiovaskulären Entwicklung (*Malemud, 2006*), bei Wundheilung und Epithelialisierung (*Birkedal Hansen et al., 1993*), bei Prozessen der Ovulation, der Implantation der Blastozyste, der postnatalen Uterusrückbildung und beim Gebärmutterschleimhautzyklus (*Nagase und Woessner, 1999*). MMP's sind aber auch beteiligt an der Krebsprogression, an der Metastasierung und an der Tumordinvasion (*Lynch und Matrisian, 2002; Malemud, 2006*), an der Ausprägung von verschiedenen Erkrankungen der Lunge (*Amălinei et al., 2010*), an atherosklerotischen Veränderungen des Herz- Kreislauf- und Gefäßsystems (*Sorsa et al., 2011*) und nicht zuletzt an der Ausbildung parodontaler Erkrankungen (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Sorsa et al., 1999; Corotti et al., 2009*), sowie akuten und chronischen periapikalen Läsionen (*Androvska et al., 2008; Caneiro et al., 2009*).

2.3.1 Bedeutung von MMP's für parodontale Erkrankungen

Parodontalerkrankungen sind Infektionskrankheiten ausgelöst durch parodontal-pathogene Trigger. Sie sind gekennzeichnet durch intensive Entzündungsinfiltrate in Gewebe sowie der gingivalen Sulcusflüssigkeit (GCF) und durch den Verlust von Bindegewebe und Knochen (*Garlet et al., 2004*). Hauptkomponenten des parodontalen ECM Abbaus sind fibrilläre Kollagene, welche während der normalen parodontalen Homöostase und vor allem bei pathologischen Zuständen, von den Kollagenasen MMP-1, -8 und -13 in kleinere Fragmente aufgespalten werden, die dann letztendlich weiter aktiv durch die Gelatinasen MMP-2 und -9, sowie andere nicht spezifische Gewebe-Proteinasen abgebaut werden können (*Dezerega et al., 2012*). Dieser Abbau von Kollagen ist in parodontologischer Hinsicht klinisch mit Gingivitis und Parodontitis assoziiert.

In der initialen Phase des Gewebeabbaues spielt das Zusammenwirken von MMP-2, -9, sowie MMP-8, -13 und -3 eine wichtige Rolle (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Tjäderhane et al., 2007*). MMP-8 scheint dabei der beste Marker zum Nachweis für parodontale Erkrankungen zu sein (*Sorsa et al., 1999*). Die Konzentration von MMP-8, steigt bei entzündlichen Veränderungen nicht nur in der entsprechenden Region an, sondern es findet auch eine Sekretion in die

gingivale Sulcusflüssigkeit statt (Sorsa *et al.*, 2011). So konnte nachgewiesen werden, dass nach „scaling und rootplanig“ die Konzentration von MMP-8 in der GCF und in der Sulcusflüssigkeit von Implantaten (PISF) deutlich reduziert war (Sorsa *et al.*, 1999). Dabei geht die Menge der MMP-Konzentration in der vorhandenen GCF mit dem Grad bzw. der Stärke der pathologischen Veränderung einher (Andonovska *et al.*, 2008; Sorsa *et al.*, 1999). Die quantitative Bestimmung von MMP-8 ist für die Bewertung der parodontalen Destruktion, sowie des parodontalen Knochenabbaus wesentlich, da diese Protease als ein entscheidender Entzündungsmarker betrachtet wird (Ehlers *et al.*, 2008). Mittlerweile stehen dafür auch sogenannte Schnelltestverfahren zu Verfügung, mit welchen in der Praxis dieser Entzündungsmarker ermittelt werden kann (Sorsa *et al.*, 1999).

In der frühen Phase der parodontalen Entzündung kommt es zu einer Einwanderung von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) und Monozyten, währenddessen die chronische Phase der Entzündung eher durch Endothelzellen und Fibroblasten bestimmt wird (Wahlgren *et al.*, 2002). Diese PMN's sind in der Lage MMP-8 (Sorsa *et al.*, 1999) sowie MMP-13, -2 und -9 (Tjäderhane *et al.*, 2007) zu sezernieren.

MMP-8 scheint dabei in der akuten oder aktiven Phase der Parodontitis eine der Leit-Proteasen zu sein, während die Anwesenheit von MMP-13 eher für einen Übergang in die chronische Phase spricht (Sorsa *et al.*, 1999). So wird MMP-13 eine Beteiligung an der Initiierung von Knochenresorptionen und an der Aktivierung von Pro-MMP-9 zugeschrieben, die durch eine sogenannte Aktivierungskaskade nach Überwindung der TIMP-1 Hemmung ausgelöst wird (Hernández Ríos *et al.*, 2009). In dieser Aktivierungskaskade aktiviert MMP-13 Pro-MMP-9, welches wiederum Pro-MMP-13 und Pro-MMP-2 in einer Verstärkungskaskade aktiviert. So schreiben Hannas *et al.*, 2007 MMP-13 ebenfalls eine Beteiligung an Interaktionen beim Knochenabbau und bei der Regulierung des Knochenniveaus zu, da es in Knochenresorptionslakunen nachgewiesen werden konnte.

Es deutet auch einiges darauf hin, dass MMP-2 (Corotti *et al.*, 2009) und MMP-9 eine sehr wichtige Rolle bei der Progression einer Parodontitis spielen (Smith *et al.*, 2004; Corotti *et al.*, 2009; de Paula-Silva *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2012). Beide MMP's waren in der akuten Phase der Parodontitis verstärkt nachweisbar und zeigten in der chronischen Phase eine Abnahme ihrer Aktivität (Corotti *et al.*, 2009).

Paradoxerweise, führt eine offensichtliche Entzündung der Gingiva über einen längeren Zeitraum bei einer Schwangerschafts-Gingivitis selten zu einer Parodontitis, was zu der Annahme führt, dass auch eine hormonale Steuerung der proteolytischen Enzyme, wie z.B. durch Progesteron nicht ausgeschlossen sein kann und ebenfalls eine Erklärung dafür sein könnte (Lapp *et al.*, 2003).

Bei der Bewertung von erhöhten MMP-Werten ist besonders interessant, dass neben der physiologischen Hemmung durch TIMP's, auch eine Hemmung durch Antibiotika wie

Doxycyclin und chemisch verändertes Tetracyclin therapeutisch möglich ist (Sorsa *et al.*, 2004, 2006).

Die Kollagenasen MMP-1 und MMP-8 sowie die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 konnten bei Entzündungen im apikalen Bereich nachgewiesen werden, wobei es aber momentan noch keine endgültigen Hinweise auf ihre Rolle im pulpalen Gewebe gibt (Wahlgren *et al.*, 2002). Die Auswertungen von Wahlgren, (2002) zeigen außerdem, dass die MMP-8 Konzentration während einer Wurzelkanalbehandlung abnimmt und demzufolge als ein Marker für die periapikale Entzündung oder die Qualität der Wurzelkanalaufbereitung dienen könnte.

Untersuchungen von Menezes-Silva *et al.*, (2012) deuten auf eine Assoziation bestimmter Genvarianten der gleichen MMP's hin. So zeigte sich, dass Genvarianten der untersuchten MMP-3 in der Lage waren, durch eine in der jeweiligen Höhe unterschiedliche Aktivität, jeweils stärkere periapikale Läsion zu produzieren.

Eine erhöhte Konzentration der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in der GCF fand sich ebenfalls in Zähnen mit einer periapikalen Läsion (Belmar *et al.*, 2008). MMP-2 und MMP-9 wurden aber auch in akuten und chronischen periapikalen Abszessen gefunden, wobei in chronisch apikalen Abszessen nur eine geringe Aktivität von MMP-2 nachgewiesen werden konnte (Buzoglu *et al.*, 2009).

Zusammenfassend kann man schließen, dass bei parodontologisch pathogenen Prozessen die MMP's-8 und -13 als Kollagenasen und die MMP's-2 und -9 als Gelatinasen in den Mittelpunkt des Interesses rücken.

2.3.2 Bedeutung der MMP's im dentalen Hartgewebe

MMP's werden ebenfalls in Verbindung gebracht, an den physiologischen Umbauprozessen und an der Degradation der extrazellulären Matrix in einer Vielzahl von Geweben, einschließlich den dentalen Hartgeweben beteiligt zu sein (Birkedal-Hansen, 1993; van Strijp *et al.*, 2003). Während allerdings das knöcherne Hartgewebe im Verlauf des gesamten Lebens umgebaut wird, werden die dentalen Hartgewebe Schmelz und Dentin in der permanenten Dentition zumindest unter physiologischen Bedingungen nicht resorbiert und umgebaut (Martin-De Las Heras *et al.*, 2000). Da sich diese Arbeit mit den MMP's beschäftigt, die ihre Lokalisation unter anderem im dentalen Zahnhartgewebe Dentin haben, an dieser Stelle noch einmal eine kurze Übersicht über strukturelle Details des Dentins.

2.3.2.1 Aufbau, Struktur und Bildung des Dentins

Der Mineralgehalt des menschlichen Dentins liegt etwas höher als der von Knochen und wird mit ca. 70% anorganischem und ca. 20% organischem Material angegeben (Linde und Goldberg, 1993). Der verbleibende Anteil von ca. 10% entfällt auf Wasser. Ein wesentlicher

Unterschied zum knöchernen Hartgewebe jedoch besteht darin, dass das Dentin selbst keine dentinbildenden Zellen mehr enthält. Struktureller Bestandteil des Dentins sind die Dentin-Tubuli, kleine Kanälchen (ca. 1 bis 1,5 µm im Durchmesser), die das Dentin von der Dentin-Schmelzgrenze bis zur Pulpa durchziehen. In ihnen liegen die sogenannten Odontoblastenfortsätze. Sie unterhalten das Dentin nach Abschluss der Zahnbildung physiologisch (Hellwig et al., 2006). Auf Grund der fehlenden zellulären Bestandteile ist eine eigentliche Neubildung oder Regeneration von abgebautem Dentin-Gewebe nicht möglich. Die ursprünglichen Odontoblasten befinden sich an der Dentin-Pulpa-Grenze. Sie besitzen jedoch zeitlebens die Fähigkeit, Tertiär-Dentin zu bilden, welches aber nur im Pulpenbereich abgelagert werden kann (Linde und Goldberg, 1993).

Neben Prädentin und Manteldentin, die sich an der äußeren und inneren Grenze des Dentins befinden, besteht die Gesamtmasse der Dentinschicht aus intertubulärem und peritubulärem Dentin (Abb. 5), welches sich zwischen bzw. um die Dentintubuli befindet (Linde und Goldberg, 1993; Hellwig et al., 2006).

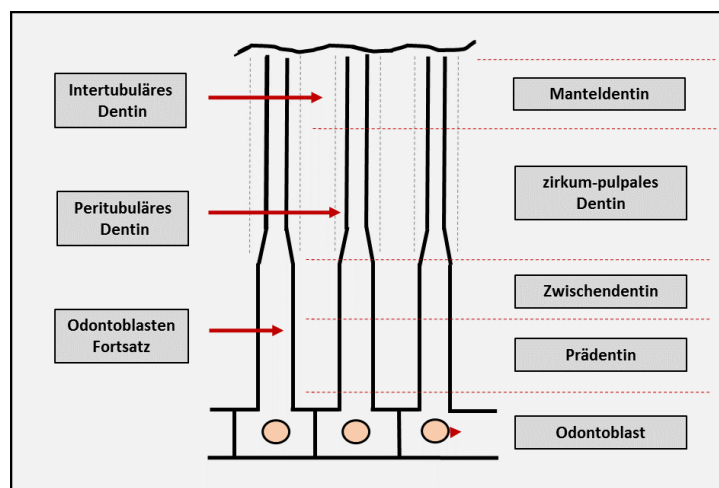


Abbildung 5: Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung und des Aufbaues des Dentins, Abbildung modifiziert nach Hellwig et al., 2006

Dentin bildende Zellen sind die Odontoblasten. Während der Zahnentwicklung schieben sich diese von der Schmelz-Dentingrenze in Richtung der zukünftigen Pulpa (Hellwig et al., 2006). Während sie auf ihrem Weg weiter die organische Matrix des Dentins, also Kollagenfasern sezernieren, bildet sich entlang ihres Weges ein zytoplasmatischer Zellfortsatz aus, der von einer kanalartigen Röhre den zukünftigen Tubuli umgeben ist. Von den Odontoblastenfortsätzen werden auch weitere nicht kollagene Proteine sowie Mineralien wie z.B. Kalzium- und Phosphat-Ionen für die Mineralisierung der Matrix ausgeschieden (Linde und Goldberg, 1993).

Das mineralische Material des Dentins besteht wie im Knochen vorwiegend aus Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (Linde und Goldberg, 1993; Hellwig et al., 2006). Das organische Material

setzt sich aus ca. 90% Kollagen vom Typ I, sowie weiteren Mengen anderer Kollagene und nicht-kollagener Proteine zusammen (Linde und Goldberg, 1993). Die Abbildung 5 verdeutlicht die Anordnung und die Verteilung der entsprechenden unterschiedlichen Dentin-Schichten innerhalb der Zahnhartsubstanzen, während die Abbildung 6 eine elektronenmikroskopische Aufnahme des intertubulären Dentins mit den deutlich sichtbaren Kollagenfasern zeigt. Die Kollagenfasern befinden sich hauptsächlich im intertubulären Dentin, in welchem sie ein dreidimensionales komplexes Netzwerk bilden (Linde und Goldberg, 1993).

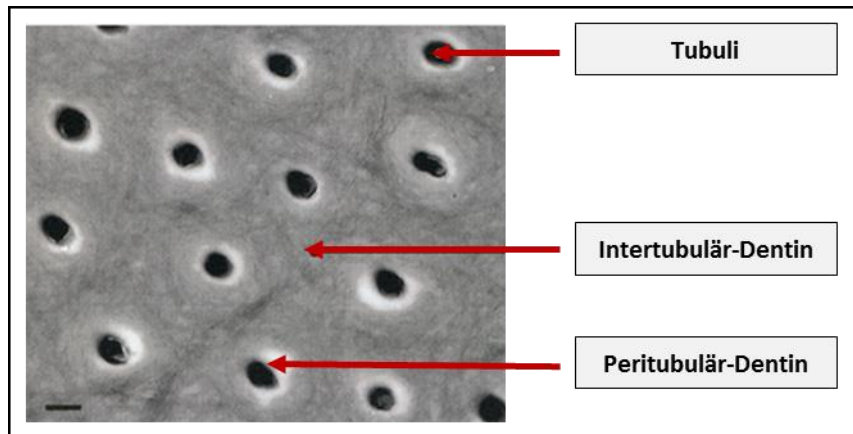


Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Dentintubuli im Wurzeldentin, Aufnahme aus dem Bildfundus der Universität des Saarlandes

Die in Abbildung 6 sichtbaren Aufhellungen um die Tubuli werden als peritubuläres Dentin bezeichnet. Es ist ein kollagenfreies aber dafür hoch mineralisiertes Material, welches nicht von den Odontoblasten-Zellkörpern, sondern von deren Fortsätzen durch Ausscheidung von Ionen und Proteinen nach der Mineralisierung des intertubulären Dentins gebildet wird (Linde und Goldberg, 1993).

2.3.2.2 Erkenntnisse über die MMP's im Dentin

Dem strukturellen Aufbau des Dentins aus Kollagen-Fasern folgernd und aus der (Vu und Werb, 2000; Lynch und Matrisian, 2002; Visse und Nagase, 2003; Bode et al., 1999; Chaussain-Miller et al., 2006; Verma und Hansch, 2007) beschriebenen Substratspezifität schlussfolgend, haben vorwiegend die MMP's, die Kollagen degradieren können, ihren Wirkungsbereich im Dentin. Dies sind vorwiegend die Kollagenasen MMP-1 (Palosaari et al., 2003; Wang et al., 2012), MMP-8 (Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2007) und MMP-13 (Palosaari et al., 2003), sowie die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 (Martin-De Las Heras et al., 2000; Mazzoni et al., 2007; Wang et al., 2012). MMP's werden vorwiegend von den Odontoblasten gebildet und sezerniert (Linde und Goldberg, 1993; Chaussain-Miller et al., 2006).

Man vermutet dabei, dass die gebildeten und sezernierten MMP's neben der degradierenden

Rolle auch eine wichtige Funktion beim physiologischen Entwicklungsmechanismus der Bildung der Zahnhartsubstanzen spielen (*Nagase und Woessner, 1999; Brew et al., 2000; Manello et al., 2006; Nagase et al., 2006; Hannas et al., 2007*). Speziell werden die MMP's-1, -2, -9, -10, -11, -14, -15, -16, -19, -20, -23 und zusätzlich die TIMP's-1, -2 und -3 sowohl von Odontoblasten als auch von Zellen des Pulpagewebes gebildet und exprimiert, während die MMP's-7, -8, -24 und -25 ausschließlich in Odontoblasten und MMP-13 und MMP-17 nur vom Pulpagewebe gebildet werden (*Palosaari et al., 2003*).

Die Lokalisation der MMP's nach der abgeschlossenen Zahnentwicklung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (*Boushell et al., 2008*), man vermutet jedoch, dass sie sich als inaktive Vorstufen im Dentin befinden (*Martin-De Las Heras et al., 2000*). Kürzlich konnte durch Immunmarkierung nachgewiesen werden, dass MMP-3 vorwiegend auf bzw. um die intertubulären Kollagenfasern lokalisiert ist. Weiterhin vermutet man lagebedingt, dass MMP-3 wahrscheinlich an physiologischen und pathologischen Vorgängen im Dentin-Pulpa-Komplex beteiligt ist (*Mazzoni et al., 2011*). Ebenfalls durch immunhistochemische Methoden (IHC) konnte ein weiterer Hinweis dafür gefunden werden, dass MMP-2 offensichtlich im Prädentin an der Schmelz-Dentin-Grenze (DEJ) in Verbindung mit den Odontoblastenfortsätzen und der Kollagenmatrix konzentriert ist (*Boushell et al., 2008*).

Solange die Dentin-Matrix-Struktur mineralisiert ist, bleiben die in ihr enthaltenen MMP's inaktiviert (*Nishitani et al., 2006*). Es wird vermutet, dass die MMP's, insbesondere die Gelatinasen, in die organische Matrix des Dentins eingebaut sind und durch die Mineralisierung des Dentins geschützt werden (*Sulkala et al., 2007*).

Kommt es jedoch zum Freiliegen von Kollagenfasern, wie z.B. bei einer geringen Entmineralisierung des Dentins durch Säureätzung mit zweistufigen Dentinadhäsiven und auch durch selbstätzende Adhäsive können im Dentin liegende MMP's, wie z.B. MMP-2 und MMP-9 aktiviert werden (*Mazzoni et al., 2013*). Die Überführung der Pro-MMP's in ihre aktivierten Formen, ist wahrscheinlich über eine Reaktion am Cystein-Schaltmechanismus der katalytischen Domäne zu erklären, welcher durch den erniedrigten pH-Wert, der bei der Säureätzung entsteht, in Gang gesetzt wird (*Chaussain-Miller et al., 2006*).

2.3.3 Bedeutung und Funktion bei Karies und Sklerosierung

Neuere Überlegungen im Hinblick auf die dentale Karies führen zu der Erkenntnis, dass die MMP's bei der Entstehung einer kariösen Läsion durch Kollagenabbau eine wichtige Rolle spielen könnten. So wird dem pH-abhängigen Aktivierungsmechanismus, der durch die bakterielle Säure erzeugt wird, eine entscheidende Bedeutung bei der Aktivierung von MMP-2, MMP-9 und MMP-8 zugeschrieben (*Tjäderhane et al., 1998; Chaussain-Miller et al., 2006*). Die wechselseitigen pH-Werte von pH 5,5 führen zum einen zu einer Entmineralisierung des Dentins mit freiliegenden Kollagenfibrillen und zum anderen zur

Aktivierung der MMP's, während in der anschließenden Neutralisierungsphase, gekennzeichnet durch einen pH-Wertanstieg, die Kollagenfasern durch die MMP's abgebaut werden (*Tjäderhane et al., 1998*).

Auf der anderen Seite vermutet man, dass die im Dentin gebundenen MMP's auch eine defensive Rolle während der Kariesprogression, z.B. durch Lösen dentingebundener Wachstumsfaktoren, spielen könnten, die dann ihrerseits wiederum an der Regulierung der komplexen Dentin-Pulpa-Abwehrreaktionen bei kariösen Läsionen beteiligt sein könnten (*Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2002*).

So spiegelt die Tatsache, dass MMP's in die Dentinmatrix eingeschlossen (*Sulkala et al., 2007*) und sich gleichfalls auch im Speichel und in der GCF befinden einen komplexen Regelmechanismus bei der Kariesausprägung wieder, da sich auch $\alpha 2$ -Makroglobulin ein starker nichtspezifischer Inhibitor von MMP's in der GCF befindet (*Chaussain-Miller et al., 2006*).

Die Aktivierbarkeit von MMP's, die seit ihrer Synthetisierung und Sezernierung in die mineralisierte Dentin-Matrix bei der Dentinogenese eingeschlossen waren, zeigt die außerordentliche Stabilität und Langlebigkeit dieser Enzyme (*Kato et al., 2011*).

Ein anderes Phänomen ist die Sklerosierung des Dentins im Alter. Durch einen ständigen Reizwechsel von unterschiedlichen Temperaturen, durch wechselnde Kaubelastungen und durch unterschiedliche orale Erkrankungen kommt es zu einer Aktivierung der im Dentin liegenden Pro-MMP's, die dann zu einer Auflösung der Kollagen-Matrix-Struktur führen und somit zu einer Sklerosierung des Dentins im Alter beitragen (*Wang et al., 2012*).

Durch ihre Forschungen an Metall-Ionen-Bindungsstellen des demineralisierten Dentins haben (*Osorio et al., 2011*) das erste Mal nachgewiesen, dass Zink-Ionen wahrscheinlich die Fähigkeit haben, ein potenter kompetitiver Inhibitor der MMP's zu sein. Damit könnten Forschungen in Hinblick auf Affinitäten zur Schaffung gewünschter „metallaktivierter Schalter“, die letztendlich zu einer Erhöhung der Dentin-Kollagen-Stabilität führen, für die dentinadhäsive Zahnheilkunde an Bedeutung zunehmen (*Osorio et al., 2011*).

2.3.4 Bedeutung und Funktion in der adhäsiven Zahnheilkunde

Eine Bindung an die Zahnhartgewebe kann durch Dentinadhäsive (Etch & Rinse), selbstätzende Dentinadhäsive (Self-Etch) und Glas-Ionomerzemente erreicht werden (*Van Meerbeek et al., 2003*). Die über einen kurzen Zeitraum gesehene Bindungsfestigkeit solcher adhäsiv vermittelter Verbindungen ist heutzutage recht günstig, jedoch gibt es Anzeichen, dass sich über einen längeren Zeitraum eine Verschlechterung dieser Bindungsfestigkeit einstellen kann (*De Munck et al., 2005; Zhang und Kern, 2009*). Dies gilt insbesondere dann, wenn eine Bindungsfestigkeit nicht nur durch Schmelz, sondern auch durch Dentin vermittelt wird (*Hebling et al., 2005*). Eine mögliche Abnahme der Bindungsstabilität vermutet man durch

einen Verlust der Integrität der Dentin-Matrix (*Ferrari et al., 2004*). Nach der Säureätzung kann es durch nicht gleichmäßige Benetzung zu einer unvollständigen Imprägnierung der Kollagenmatrix kommen (*Zhang et al., 2009*). Es hat sich gezeigt, dass in der Dentin-Matrix eingeschlossene wirtseigene Proteasen (MMP's), freiliegende Kollagenfasern in der Hybridschicht angreifen und abbauen können (*Pashley et al., 2004; De Munck et al., 2005; Nishitani et al., 2006; Zhang und Kern, 2009; Mazzoni et al., 2013*). Solange die MMP's in der mineralisierten Dentin-Matrix eingeschlossen sind, bleiben sie strukturell stabil und damit inaktiv (*Nishitani et al., 2006*). Durch Säureätzung wird das Kollagennetzwerk des Dentins freigelegt (*Van Meerbeek et al., 2003*).

Während die Freilegung des Kollagen-Netzwerkes durch Säureätzung mit „Etch & Rinse“ Materialien und damit eine Aktivierung eingeschlossener MMP's als relativ gesichert scheint (*Nishitani et al., 2006; Mazzoni et al., 2013*), ist die aktuelle Studienlage über eine Aktivierung der MMP's durch „Self-Etch“ und „All in one Adhäsive“ relativ umstritten (*Pashley et al., 2004; Nishitani et al., 2006; De Munck et al., 2009, 2010; Mazzoni et al., 2009, 2013*).

Das Kollagennetzwerk des Dentins liegt frei, sobald das Hydroxylapatit in Lösung geht. Bei allen adhäsiven Restaurationen kann durch die Anwendung der unterschiedlichen Dentinadhäsiv-Systeme das Dentin demineralisieren, indem aus der Dentinoberfläche Hydroxylapatit herausgelöst wird. Dünne Dentinadhäsivschichten wirken dabei analog einer semipermeablen Membran. Das Wasser wird durch Monomere des Dentinadhäsives verdrängt und so das Kollagennetzwerk infiltriert. Es bildet sich eine Hybridschicht. MMP's können dabei z.B. aktiviert werden und in die Hybridschicht eingeschlossen werden. Durch die Wasserdurchlässigkeit bietet sie aktivierten MMP's die Möglichkeit, ihre hydrolytische Funktion gegenüber Kollagenfibrillen auszuüben und so das kollagene Netzwerk zu zerstören (*Zhang und Kern, 2009; Beer, 2010; De Munck et al., 2010; Beer, 2011*).

Aus klinischer Sicht wäre es deshalb sicherlich vorteilhaft, wenn man in der Lage wäre eine Aktivierung der MMP's oder eine Infiltration der Hybridschicht zu verhindern (*Pashley et al., 2004*).

Daher wird momentan die Anwendung von einigen spezifischen MMP-Inhibitoren, die kollagenolytische und gelatinolytische Aktivitäten im Dentin unterdrücken können, wie z.B. EDTA (*Martin-De Las Heras et al., 2000; Pashley et al., 2004*) und Chlorhexidin (*Hebling et al., 2005; Zhang und Kern, 2009*) empfohlen und weiter untersucht, um eine Verschlechterung der Hybridschichten zu beschränken.

2.4 Kollagenasen und Gelatinasen

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, dass für das Betrachtungsfeld in der Zahnmedizin in Hinblick auf die Beteiligung der MMP's speziell an Entzündungsreaktionen und

am dentinadhäsiven Haftungsverbund an Schmelz und Dentinoberflächen, die Kollagenasen und Gelatinasen eine wichtige Rolle einnehmen. Aus diesem Grund sollen nun noch einmal einige chemisch biologische Strukturmerkmale dieser MMP's detailliert dargestellt werden. Kollagenasen und Gelatinase wirken im Zusammenspiel. Die Zusammenarbeit zwischen den interstitiellen Kollagenasen und Gelatinasen wird als wesentlich angesehen für den Abbau der interstitiellen Kollagene im Gewebe während entzündlicher oder pathologischer Prozesse (*Toledano et al., 2010*). Im Allgemeinen wird Kollagen in Peptide mit einer Länge $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Proteins durch die Kollagenasen, wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 aufgespalten, die dann anschließend von den Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 weiter abgebaut werden können (*Chaussain-Miller et al., 2006*).

2.4.1 Spezifität der Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13)

MMP-1 wird von Fibroblasten, Makrophagen, Osteoblasten und in anderen Zellen des Granulationsgewebes synthetisiert, als Pro-MMP-1 sezerniert und entfaltet seine Aktivität vorwiegend in der Nähe einer Wundumgebung (*Amălinei et al., 2010*). Von der Kollagenase MMP-1 existieren zwei unterschiedliche Formen, eine weniger glykolisierte Form mit einem Molekulargewicht von 52 kDa und eine glykolisierte Form mit einem Gewicht von 57 kDa. Nach der Entfernung der jeweiligen Propeptide entstehen mit einem Molekulargewicht von 42 und 48 kDa jeweils die aktiven Formen (*Sorsa et al., 2006*). MMP-1 kann örtlich begrenzt interstitielle Kollagene abbauen.

MMP-8 wird von polymorphkernigen Leukozyten während der Reifung dieser im Knochenmark synthetisiert und in der glykolisierten Form in der subzellulären spezifischen Granula gespeichert, von welcher es durch selektive Degranulation bei Entzündungsreaktionen freigesetzt wird (*Sorsa et al., 2006; Tjäderhane et al., 2007*). Es ist maßgeblich an pathologisch parodontalen Prozessen, wie der akuten Parodontitis beteiligt und kann mittlerweile als eines der Leitenzyme angesehen und durch entsprechende Schnelltestverfahren in der Praxis nachgewiesen werden (*Sorsa et al., 2004*). Es besitzt eine Substratspezifität zu Kollagen II / III und Aggrecan. Außerdem ist es die Hauptkollagenase zum Abbau von Kollagen vom Typ I, welches bei Körpertemperatur denaturiert und durch die Gelatinasen weiter abgebaut werden kann (*Lynch und Matrisian, 2002; Visse und Nagase, 2003; Chaussain-Miller et al., 2006*).

MMP-13 wird ebenfalls von polymorphkernigen Leukozyten synthetisiert und als Pro-MMP-13 sezerniert (*Tjäderhane et al., 2007*). MMP-13 hat eine sehr eingeschränkte Sekretionsrate, da es über eine sehr breite Substratspezifität verfügt und ein katalytisch sehr effizientes Enzym ist (*Sorsa et al., 2006*). Genau wie die anderen Kollagenasen, wie MMP-1 und MMP-8, spaltet es Kollagen an einer einzigen Stelle, was zur Bildung von zwei verschiedenen Fragmenten

führt, während bakterielle Proteinasen an mehreren Stellen des Kollagens angreifen können und so viele kurze Peptidfragmente entstehen (*Sorsa et al., 2004*).

2.4.2 Spezifität der Gelatinasen (MMP-2 und -9)

MMP-2 wird von polymorphkernigen Leukozyten (*Tjäderhane et al., 2007*), Keratinozyten, Endothelzellen sowie Odontoblasten (*Amălinei et al., 2010*) synthetisiert und als Pro-MMP-2 sezerniert. Pro-MMP-2 hat als zymogene Vorstufe ein Molekulargewicht von 72 kDa. In der aktivierten Form beträgt das Molekulargewicht 66 kDa. MMP-2 kann nur auf der Zelloberfläche mit Hilfe von MT1-MMP aktiviert werden. Hierzu muss sich Pro-MMP-2 zuerst mit einem Komplex, der aus MT1-MMP an den zusätzlich ein TIMP-2 gebunden ist, verbinden. Um die Aktivierung aber abzuschließen bedarf es jetzt noch eines weiteren MT1-MMP (*Chaussain-Miller et al., 2006; Amălinei et al., 2007*). MMP-2 ist vorwiegend im intratubulären fibrillären Kollagengeflecht des Dentins lokalisiert (*Mazzoni et al., 2009*). Daneben scheint MMP-2 wahrscheinlich aber auch im Prädentin an der Schmelz-Dentin-Grenze (DEJ) in Verbindung mit den Odontoblastenfortsätzen und der Kollagenmatrix lokalisiert zu sein (*Boushell et al., 2008*).

MMP-9 wird von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Endothelzellen synthetisiert und als Pro-MMP-9 in die ECM sezerniert. Pro-MMP-9 hat als zymogene Vorstufe ein Molekulargewicht von 92 kDa. Als aktivierte Proteinase beträgt das Molekulargewicht dann 86 kDa. Bakterielle Proteinasen und MMP-3 führen zu einer Aktivierung und TIMP-1 und α 2-Makroglobulin führen zu einer Hemmung der Aktivität (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Chaussain-Miller et al., 2006*). Zu den Substraten zählen unter anderem Kollagene vom Typ IV / V / VII / X und XI, sowie Fibronectin, Aggrecan und durch Kollagenasen denaturiertes Kollagen vom Typ I (*Birkedal-Hansen et al., 1993; Lynch und Matrisian 2002; Visse und Nagase, 2003*). MMP-9 ist vorwiegend an Entzündungsreaktionen beteiligt (*Buzoglu et al., 2009; Carneiro et al., 2009*). Es werden aber auch Beteiligungen an der Wundheilung und an der Gewebe-Remodulation beschrieben (*Birkedal-Hansen et al., 1993*).

2.4.3 Nachweismethoden von Kollagenasen und Gelatinasen

Die Molekulargewichte haben eine entscheidende Bedeutung beim Nachweis von MMP's. Die Expression von MMP's kann mit verschiedenen Techniken analysiert werden. Eine weit verbreitete Technik ist die Substrat-Zymographie, die MMP's durch die Zerstörung ihrer Vorzugs Substrat und durch ihr Molekulargewicht identifiziert (*Snoek-van Beurden und Von den Hoff, 2005*). Zymographie basiert auf den folgenden Grundsätzen: (1.) während der

Elektrophorese wird Gelatine (oder ein anderes Substrat) im Gel zurückgehalten, (2.) die MMP-Aktivität wird durch Zugabe von SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) reversibel während der Elektrophorese inhibiert, die zu untersuchende Protease wird dabei denaturiert aber nicht erhitzt und (3.) SDS bewirkt die Trennung der MMP-TIMP-Komplexe während der Elektrophorese. Anschließend wird nach der Entfernung von SDS das Gel in einer Pufferlösung inkubiert, wobei die enzymatische Aktivität durch die im Gel enthaltenen Substrate ermöglicht wird. Am Ende wird das Gel mit einem Farbstoff (Comassie-Blau) gefärbt. Die Stellen an denen eine enzymatische Aktivität stattgefunden hat, weisen jetzt eine transparente Färbung auf (*Snoek-van Beurden und Von den Hoff, 2005*).

Ein zusätzlicher Vorteil der Zymographie ist, dass sowohl die Pro-Enzyme und die aktiven Formen von MMP's auf der Grundlage ihres Molekulargewichts unterschieden werden (*Snoek-van Beurden und Von den Hoff, 2005*). Man unterscheidet abhängig von der Substratspezifität der entsprechenden MMP's die Gelatin Zymographie für den Nachweis von MMP-2 und MMP-9, die Casein Zymographie für den Nachweis von MMP-1, MMP-7, MMP-12 und MMP-13 und die Reverse Zymographie für den Nachweis der entsprechenden TIMP's.

2.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass MMP's proteolytisch wirkende Enzyme sind, die am Aufbau bzw. der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix wesentlich beteiligt sind (*Nagase und Woessner, 1999; Visse und Nagase, 2003; van Strijp et al., 2003; Verstappen und Von den Hoff, 2006; Verma und Hansch, 2007*). Dazu zählen besonders fibrilläre Kollagene (*Dezerega et al., 2012*) und als einer der Hauptbestandteile des Dentins zu 90% Kollagen vom Typ I (*Linde und Goldberg, 1993*). Kommt es durch Entmineralisierung des Dentins zum Freiliegen von Kollagenfasern und werden dabei gleichfalls Pro-MMP's in ihre aktiven Formen überführt, können die aktivierten Kollagenasen und Gelatinasen die freiliegenden Kollagenfasern degradieren (*Mazzoni et al., 2013*).

Dies scheint anhand der Literatur von entscheidender Bedeutung für verschiedene Bereiche, vor allem in der adhäsiven Zahnheilkunde zu sein. In der Literaturübersicht zeigt sich vor allem, dass sich der Nachweis kollagenolytischer und gelatinolytischer Aktivität im Dentin, vorwiegend auf das koronale Dentin beschränkt. Mit der heute zunehmenden Bedeutung der adhäsiven Zahnheilkunde, wie z.B. mit der adhäsiven Befestigung von Wurzelstiften und zusätzlichen Verankerungstags von Endo-Kronen im koronalen Drittel der Wurzel, wird auch hier die Frage nach der Stabilität, der Hybridschicht (siehe 2.3.4.) an Wichtigkeit zunehmen. Gleichfalls lässt die Literaturstudie aber durchaus auch die Vermutung offen, dass es neben bestimmten mechanischen Gründen für Wurzelfrakturen, auch zu Frakturen der Wurzel durch eine Schwächung der Kollagenmatrix des Dentins durch MMP-Degradation kommen könnte.

So wurde in einer *In-vitro* Studie nachgewiesen, dass es bei endodontisch behandelten Zähnen mit einer Stiftversorgung über einen längeren klinischen Alterungszeitraum zu einer Auflösung der strukturellen Integrität der Kollagen-Matrix im Wurzeldentin gekommen ist (*Ferrari et al., 2004*). Über die Zersetzung der Matrix entweder durch bakterielle Besiedelung und deren Abbauprodukte oder durch eine Aktivierung wirtseigener MMP's konnten jedoch nur Vermutungen angestellt werden, da sich die experimentellen Auswertungen auf elektronenmikroskopische Verfahren beschränkten.

Ausgehend von der bisherigen Studienlage setzen hier die Überlegungen an, sich mit der enzymatischen Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne etwas näher zu beschäftigen. In der Literatur gibt es dazu wissentlich keine gesicherten Erkenntnisse. Grundlegend stellt sich die Frage, ob die Kollagen-Matrix im Bereich des Wurzel-Dentins durch die Aktivierung von wirtseigenen MMP's bei endodontisch behandelten Zähnen über einen klinischen Alterungszeitraum verändert werden kann.

Diese Studienarbeit geht der Fragestellung nach, die **Hypothese** zu testen, dass es im Wurzeldentin endodontisch behandelter Zähne eine enzymatische Aktivität durch das Vorhandensein von MMP's gibt. Die **Null-Hypothese** testet dabei die Aussage, dass sich keine Unterschiede der MMP-Aktivität im Wurzeldentin endodontisch und nicht endodontisch behandelter Zähne nachweisen lassen.

Im Detail sollten nun die folgenden Fragestellungen erste orientierende Erkenntnisse zu dieser Thematik erbringen:

1. Gibt es eine nachweisbare enzymatische Aktivität von MMP's im Wurzel-Dentin von endodontisch behandelten Zähnen und lässt sich diese im Gegensatz zum Dentinpulver auch am Dentin-Hartmaterial nachweisen?
2. Gibt es Unterschiede zwischen einer unspezifischen gelatinolytischen und kollagenolytischen enzymatischen Aktivität im Wurzeldentin endodontisch und nicht endodontisch behandelter Zähne?
3. Lassen sich Unterschiede in der Verteilung einer durch MMP's hervorgerufenen enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins eines Zahnes von koronal nach apikal nachweisen?
4. Lassen sich Unterschiede in der Verteilung einer durch MMP's hervorgerufenen enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins zwischen den einzelnen Schnittebenen einer Zahn-Wurzel bei endodontisch und nicht endodontisch behandelten Zähnen finden?
5. Gibt es einen Einfluss von verschiedenen Lagerungsmedien auf die nachzuweisende enzymatische Aktivität im Wurzel-Dentin?

3 Material und Methode

Zur Bearbeitung und Beantwortung der aufgeworfenen und zugrundeliegenden Fragestellung wurden humane Zähne verwendet. Das Zahnmaterial wurde von Patienten nach erfolgter Extraktion zurückgelassen und unsererseits anonymisiert gesammelt. Dabei erfolgte die Behandlung des Zahnmaterials nach den Vorgaben und Richtlinien der Zentralen Ethikkommission Deutschlands.

In den Hauptversuchen mit seinen unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde entsprechend untersucht, ob sich im Gegensatz zur Bestimmung einer proteolytischen Aktivität innerhalb von pulverisiertem Dentin, auch am reinen Dentin-Hartmaterial (Dentin-Scheiben) eine proteolytische Aktivität von Enzymen nachweisen lässt. Für diese enzymatischen Aktivitätstestungen wurden als Dentin-Hartmaterial aus der Zahnwurzel geschnittene Dentin-Scheiben und das *Gelatinase / Collagenase Assay Kit (E12055)* EnzChek® der Firma *Molecular Probes® (Eugene, OR, USA)* verwendet.

In zwei dazu parallel verlaufenden Versuchsreihen, wurde auf Grundlage einer zuvor durchgeführten Literaturstudie geprüft, ob die Auswahl bzw. letztendlich die Lagerung von Untersuchungsproben in einem entsprechenden Lagerungsmedium einen Einfluss auf die zu untersuchenden Parameter in den Untersuchungsproben haben könnte. Hierzu wurden folgende fünf Lagerungsmedien getestet: normales Leitungswasser (H₂O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige Thymollösung und 1%ige Thymollösung. Als weiteres Lagerungsmedium wurde eine Tiefkühlung der entsprechenden Präparate bei -28°C getestet.

3.1 Material

In bisherigen Studien wurde die enzymatische Aktivität im Dentin ausschließlich am pulverisierten Dentin (*Martin De Las Heras et al., 2000; Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2007, 2011*) durchgeführt. Die Verwendung von Dentin-Hartmaterial für die enzymatische Testung ist bisher nicht im Detail beschrieben. Deshalb wurde für die Durchführung, des in dieser Studie verwendeten Zahnmaterials, bewusst Dentin-Hartgewebe gewählt, um einen Weg zu klassifizieren, enzymatische Aktivität unter *In-vitro* Bedingungen nachzuweisen und testen zu können.

3.1.1 Auswahl und Kriterien an das Untersuchungsmaterial

- Als Untersuchungsmaterial für die Vorversuche zur enzymatischen Aktivitätstestung am Dentin-Hartmaterial wurden endodontisch behandelte und mit einer dementsprechenden Wurzelfüllung versehene, im Wurzelbereich kariesfreie, humane

Zähne (Frontzähne, Prämolaren, Molaren) ausgewählt. Die ausgewählten endodontisch behandelten Zähne wurden der Untersuchungsgruppe 1 (UG 1) zugeteilt.

- Für eine erste Kontrollgruppe wurden ebenfalls humane, im Wurzelbereich kariesfreie Zähne (Frontzähne, Prämolaren, Molaren), jedoch ohne endodontische Behandlung und dementsprechende Wurzelfüllung ausgewählt. Die ausgewählten Zähne dieser Kontrollgruppe wurden in die Untersuchungsgruppe 2 (UG 2) eingegliedert.
- Für eine weitere Kontrollgruppe bzw. auch für die Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien wurden Zähne gesammelt und verwendet, die zwar die normale physiologische und anatomische Entwicklung durchlaufen haben, jedoch noch nicht in der Mundhöhle exponiert waren. Diese wurden mittels chirurgischer Osteotomie gewonnen. Per Zufallsentscheidung wurden diese Zähne der Untersuchungsgruppe 3 (UG 3) für proteolytische Untersuchungen am Dentin-Hartmaterial und der Versuchsreihen für die Lagerungsmedien zugeteilt. Dafür wurden ausschließlich Zähne mit einem annähernd gleichen Entwicklungsstadium (obere und untere dritte Molare) verwendet.

3.1.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

- Das Untersuchungsmaterial von jeweils insgesamt 10 Zähnen, für die Untersuchungsgruppen 1, 2 und 3 sowie für die Untersuchungen mit den Lagerungsmedien wurde durch die Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnerhaltung, sowie durch die Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität des Saarlandes und einer kieferchirurgischen Praxis des Enzkreises zur Verfügung gestellt.
- Die ausgesuchten Zähne der Untersuchungsgruppen 1, 2 und 3 waren durch die Extraktion bzw. Osteotomie im Wurzelbereich sichtlich unbeschädigt.
- Die Zähne wurden in 0,1%iger Thymollösung bis zur weiteren Verwendung bei Zimmertemperatur gelagert.
- Dagegen wurde das Untersuchungsmaterial für die Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien in normalem Leitungswasser (H₂O) gesondert und ebenfalls bei Zimmertemperatur gelagert.

3.1.3 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

- In einem ersten Schritt, wurden alle Zähne zunächst oberflächlich durch einfaches Abspülen unter Leitungswasser von Zahnstein und desmodontalen Geweberesten befreit.
- Zur Vorbereitung des Untersuchungsmaterials wurden danach mittels einer

Diamanttrennscheibe (*Superflex / 358. 514. 190*) oder (*Superflex Turbo / 505. 514. 190*) der Firma *NTI® (Kahla, TH, Deutschland)* das Kronendentin und die unteren 1 bis 2 mm der Wurzelspitze entfernt.

- Weiterhin wurde die äußere Wurzeloberfläche zur Entfernung eventueller biologischer Gewebeverunreinigungen mittels eines Scalers (*T2/T3 DB 350R*) und Küretten (*L1/L2 DB 330R; L3/L4 DB 331R; L4/L5 DB 332R*) der Firma *Aesculap® (Tuttlingen, BW, Deutschland)* entsprechend der jeweiligen Wurzelform gescalt und kürettet.
- In einem weiteren Schritt wurde das Wurzelzement mit einem Technikdiamanten (*850-014M-HP*) der Firma *NTI®* entfernt.
- Zur Entfernung der alten Wurzelfüllung aus dem Wurzelkanallumen bei den wurzelbehandelten Zähnen wurden in einem ersten Schritt maschinelle Revisionsfeilen der ISO-Größe 15/05 und 25/05 des Systems *Mtwo®* der Firma *VDW® (München, BY, Deutschland)* verwendet. Die komplette Entfernung und weitere Aufbereitung des Wurzelkanals erfolgte mittels maschinellen Aufbereitungsfeilen der ISO-Größe 25/06 und 25/07 des Systems *Mtwo®* der Firma *VDW®*. Abschließend erfolgte eine Feinsäuberung des Wurzelkanals mittels Hedstömfeilen der ISO-Größen 40 und 45 der Firma *VDW®*.
- Im Anschluss an die Aufbereitung wurden die Wurzelkanäle zur Entfernung sämtlicher Abriebspähne durch Spülung mit 1%iger physiologischer Kochsalzlösung gereinigt.
- Zur abschließenden Kontrolle wurde mit einem Röntgengerät *Heliodent DS (Seriel No 27344)* der Firma *Sirona® (Bensheim, BW, Deutschland)* ein Röntgenbild bei 60 KV und 7 mA auf einer digitalen Speicherkarte der Firma *Dürr-Dental® (Bietigheim-Bissingen, BW, Deutschland)* angefertigt. Die anschließende Bildverarbeitung erfolgte mit dem System *Vistascan® (Seriel No D244155103)* der Firma *Dürr-Dental®* und der Röntgensoftware *Sidexis XG 2.6 (Reg No 9931192748)* der Firma *Sirona®*.
- Bei noch festgestellten Verunreinigungen des Wurzelkanals durch Wurzelfüllmaterial wurden die Arbeitsschritte der Feinsäuberung und der Anfertigung des Röntgenbildes jeweils wiederholt.
- Bei den Zähnen für die Kontrollgruppen (UG 2 und UG 3) und den Zähnen für die Versuche mit den Lagerungsmedien wurden die Wurzelkanäle mit dem gleichem Instrumentarium nach dem gleichen Schema aufbereitet.
- Bis zur weiteren Verwendung des Untersuchungsmaterials wurden die vorbehandelten Präparate für die Untersuchungs- und Kontrollgruppen jeweils in *Eppendorf-Tubes 2,0 ml* in 0,1%iger Thymollösung bei Zimmertemperatur gelagert.
- Die Präparate für die Testung einer eventuellen Beeinflussung der zu untersuchenden Parameter durch die Lagerungsmedien, wurden dagegen in normalem Leitungswasser (H_2O) gesondert und ebenfalls wieder bei Zimmertemperatur gelagert.

3.1.4 Gewinnung der Einzelproben

- Vor der weiteren Verarbeitung des vorbereiteten Untersuchungsmaterials (Zahn-Wurzeln) wurde dieses aus der 0,1%igen Thymollösung bzw. aus dem normalen Leitungswasser (H_2O) kommend, 24 h in Wasser ($\text{d-H}_2\text{O}$) bei Zimmertemperatur zur Spülung gelagert.

3.1.4.1 Einzelproben für die enzymatische Testung am Dentin-Hartmaterial

- Nach Trocknung der Zahn-Wurzeln mit einem Labor-Druckluftbläser mit 1 bar, erfolgte in den bezeichneten Schnittebenen maschinell die horizontale Heraustrennung einzelner Dentin-Scheiben (Abb. 7/8) mit einer galvanisierten und diamantierten Trennscheibe ($\varnothing 100 \times 0,6$) der Firma Scott Diamant Werkzeuge GmbH (Stadtoldendorf, NI, Deutschland) und mittels einer Sägemaschine der Firma Conrad Apparatebau GmbH (Clausthal-Zellerfeld, BY, Deutschland) jeweils unter kompletter Wasserkühlung. Die Dentin-Scheiben hatten eine Dicke von ca. 1 bis 1,5 mm und einen Durchmesser von 5 bis 7 mm, je nach anatomischem Wurzelquerschnitt der entsprechenden Zahn-Wurzeln.
- Insgesamt wurden drei Schnittebenen innerhalb der Zahnwurzel generiert: koronal, medial und apikal. (Abb. 7)

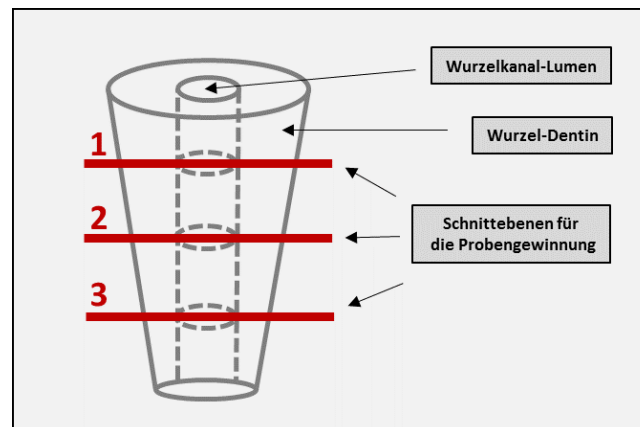


Abbildung 7: Schematische Darstellung der generierten Schnittebenen von koronal nach apikal innerhalb einer Zahn-Wurzel zur Einzelprobengewinnung

- Es wurde pro Schnittebene jeweils nur eine Dentinscheibe für die Untersuchung gewonnen (Abb. 8).
- Für die Untersuchungsgruppen 1, 2 und 3 waren das in der Summe insgesamt 30 Dentin-Scheiben pro einzelne Gruppe.
- Zur enzymatischen Testung einer proteolytischen Aktivität am Dentin-Hartmaterial mit dem *EnzChek®*-System wurden somit insgesamt 90 Dentin-Scheiben vorbereitet.

- Um eventuelle Unebenheiten wie z.B. Sägelinien auf der Oberfläche der Dentin-Scheiben zu beseitigen und um Scheiben von einer annähernd gleichmäßigen Dicke zu erhalten, wurden diese von beiden Seiten einer Oberflächenpolitur unter Verwendung einer Poliermaschine *Metkon GR.PO 2V* der Firma *Buehler®* (Lake Bluff, IL, USA) unterzogen. Zur Politur wurde *Silicon Carbside Grinding-Papier* der Körnung P 2500 der Firma *Buehler®* verwendet. Poliert wurde bei einer Umdrehungszahl von 300 U/min unter ständiger Wasserkühlung.

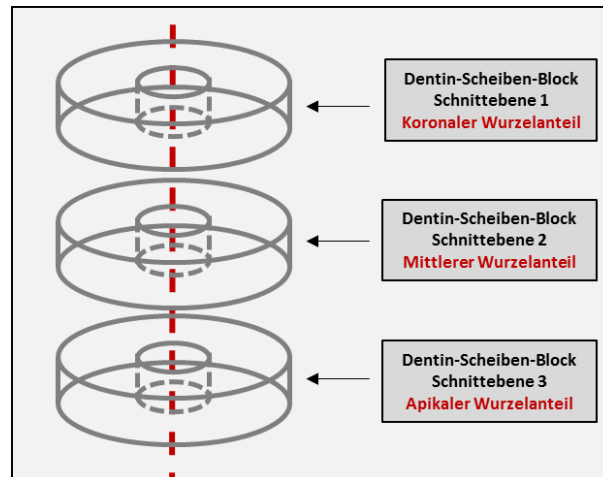


Abbildung 8: Schematische Darstellung der einzelnen gewonnenen Dentin-Scheiben aus einer Zahnwurzel jeweils koronal, medial und apikal

3.1.4.2 Einzelproben für die Testung der Lagerungsmedien

- Zur Untersuchung wurden insgesamt 10 frisch extrahierte obere und untere Molaren verwendet. Diese wurden per Zufallsprinzip auf je zwei Versuchsansätze aufgeteilt.
- Die Lagerung und Verarbeitung bis zur Herstellung der Einzelproben entspricht der bereits dargelegten Verfahrensweise.
- Für den Versuchsansatz 1 wurden je fünf der Zähne, wie in der Anleitung (Punkt 3.1.4.1) beschrieben, zu Dentin-Scheiben verarbeitet. Insgesamt wurden jedoch abweichend zur bisherigen Vorgehensweise aus jeder Zahn-Wurzel fünf Dentin-Scheiben gewonnen. Je eine Dentin-Scheibe aus einer Zahn-Wurzel, wurde dann zufällig auf die einzelnen unterschiedlichen Lagerungsmedien aufgeteilt.
- Somit standen für die enzymatischen Untersuchungen im Versuchsansatz 1 insgesamt 25 Dentin-Scheiben zur Verfügung, fünf je Lagerungsmedium.
- Die anderen fünf Molaren wurden für den Versuchsansatz 2 verwendet. Im Gegensatz zur bisher dargestellten Vorgehensweise der Aufbereitung der Proben wurde das Zahnmaterial jedoch nur äußerlich grob gereinigt und es erfolgte die Entfernung von Geweberesten inklusive des Zahnzementes. Je ein kompletter Zahn wurde danach in den entsprechenden Lagerungsmedien gelagert.

- Die gelagerten Zähne des Versuchsansatzes 2 wurden erst 24 h vor der enzymatischen Testung zu Dentin-Scheiben verarbeitet.
- Es wurden ebenfalls 25 Dentin-Scheiben für diesen Versuchsansatz gefertigt.
- Für die enzymatische Testung nach entsprechender Lagerung in den ausgewählten Lagerungsmedien wurden somit insgesamt 50 Dentin-Scheiben verwendet.

3.1.5 Lagerung und Beschriftung der gewonnenen Einzelproben

- Da die enzymatischen Aktivitätstestungen jeweils an den Oberflächen der entsprechenden Dentin-Scheiben vorgenommen wurden und diese zudem noch poliert waren, wurden diese nicht beschriftet oder mit einer Kennzeichnung versehen. Jedoch wurden zur Unterscheidung und genauen Zuteilung die *Eppendorf Safe-Lock Tubes* mit einer dementsprechenden Kennzeichnung versehen.

3.1.5.1 Lagerung der Einzelproben für die enzymatischen Testungen

- Alle gewonnenen Einzelproben der Untersuchungsgruppen 1, 2 und 3 wurden bis zur enzymatischen Testung in *Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml* in 0,1%iger Thymollösung im Kühlschrank gelagert.

3.1.5.2 Lagerung der Proben für die Untersuchungen der unterschiedlichen Lagerungsmedien

- Insgesamt wurden die Proben für beide Versuchsansätze über einen Zeitraum von 65 Tagen in den jeweiligen fünf entsprechenden Lagerungsmedien gelagert. Als Lagerungsmedien wurden normales Leitungswasser (H₂O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige und 1%ige Thymollösung verwendet. Als weiteres Lagerungsmedium wurde eine Tiefkühlung der entsprechenden Präparate bei -28°C getestet
- Dabei sind die Einzelproben des Versuchsansatzes 1 und die Komplettzähne des Versuchsansatzes 2 jeweils in beschrifteten *Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml* in den entsprechenden Lagerungsmedien über den beschriebenen Lagerungszeitraum im Kühlschrank und die Proben zur Testung des Lagerungsmediums „Frost“ im Tiefkühlschrank bei -28°C gelagert worden.

3.1.6 Verwendete Geräte, Instrumente und Lösungen

Tabelle 3 gibt nochmals einen Gesamtüberblick über die bei der Gewinnung und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials verwendeten Geräte, Instrumente und Lösungen.

Tabelle 3: Geräte, Instrumente und Lösungen die zur Auf- und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials der Vorversuche verwendet wurden

Instrumente	Hersteller / Firma / Stadt / Land
Diamanttrennscheibe (Superflex Turbo 505 514 190)	NTI, Kahla, TH, Deutschland
Diamanttrennscheibe (Superflex 358 514 190)	NTI, Kahla, TH, Deutschland
Diamantierte Trennscheibe (Ø100 x 0,6)	Scott, Stadtdendorf, NI, Deutschland
Hedstömfeilen (iso-40)	VDW, München, BY, Deutschland
Hedstömfeilen (iso-45)	VDW, München, BY, Deutschland
Küretten (L1/L2 DB 330R)	Aesculap, Tuttlingen, BW, Deutschland
Küretten (L3/L4 DB 331R)	Aesculap, Tuttlingen, BW, Deutschland
Küretten (L4/L5 DB 332R)	Aesculap, Tuttlingen, BW, Deutschland
Mtwo Endo-feilen Basissequenz (007 021 701) AT 16 mm	VDW, München, BY, Deutschland
Mtwo Revisionsfeilen iso-15/05 (0232 021 015) AT 16 mm	VDW, München, BY, Deutschland
Mtwo Revisionsfeilen iso-25/05 (0232 021 025) AT 16 mm	VDW, München, BY, Deutschland
Scaler (T2/T3 DB 350 R)	Aesculap, Tuttlingen, BW, Deutschland
Scalpelle	HU-Friedy, Chicago, Illinois, USA
Technikdiamanten (850-014M-HP)	NTI, Kahla, TH, Deutschland
Gerätschaften / Softwareprogramme	Hersteller / Firma Stadt / Land
elektronische Waage Sartorius Typ CP 432 S	Sartorius, Göttingen, NI, Deutschland
Fluoreszenzdetector GENios Firmware V4.62- 07/01	Tecan, Salzburg, S, Austria
Greiner Flat Bottom Black Polystyrol (96-Well-Mikroplatte)	G-Bio-One, Frickenhausen, BW, Deutschland
Inkubator WTB Binder B28 Series	Binder, Tuttlingen, BW, Deutschland
Poliermaschine Metkon GR.PO 2V	Buehler, Lake Bluff, IL, USA
Röntgengerät Helident DS (Seriel No. 27344)	Sirona, Bensheim, BW, Deutschland
Rüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Sägemaschine	Conrad, Clausthal-Zellerfeld, BY, Deutschland
Sidexis XG 2.6	Sirona, Bensheim, BW, Deutschland
Silicon Carbside Grinding-Papier der Körnung P 2500	Buehler, Lake Bluff, IL, USA
Software Tecan-i-control 1.10.4.0	Tecan, Salzburg, S, Austria
Vista-scan	Dürr-Dental, Bietigheim, BW, Deutschland
Lösungen	Hersteller / Firma Stadt / Land
d-H ₂ O Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland
0,5 M EDTA - Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland
Kochsalzlösung	Merck, Darmstadt, BW, Deutschland
0,05%ige Natrium-Azid-Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland
0,1%ige Thymol-Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland
1%ige Thymol-Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland
70%ige Alkohol-Lösung	Uni Saarland, Homburg, SL, Deutschland

3.2 Methode

Da es sich beim Nachweis einer enzymatischen (proteolytischen) Aktivität um eine zeitlich über einen längeren Zeitraum ablaufende biochemische Reaktion handelt, sind geeignete Testverfahren notwendig, die eine Veränderung der zu messenden Parameter über einen zeitlichen Verlauf zuverlässig abbilden.

3.2.1 Enzymatische Aktivitätsmessung: Prinzip der EnzChek®-Methodik

Das EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* ist ein empfindliches Verfahren zur Bestimmung einer enzymatischen Aktivität. Durch das System wird dabei unspezifisch auf gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität im Untersuchungsmedium getestet. Der

Nachweis einer enzymatischen Aktivität erfolgt mit Hilfe fluoreszenzmarkierter *Gelatine DQ™*, die aus der Schweine-Haut gewonnen wird und dem Test als Substrat beigelegt ist. Eine Umsetzung dieses Substrates in einem entsprechenden Untersuchungsmedium, also die Aufspaltung in einzelne Peptide, bedeutet demzufolge enzymatische Aktivität. Entstehen Peptide aus der *Gelatine DQ™*, so haben diese eine wesentlich höhere Fluoreszenz, als das nicht umgesetzte Gesamtsubstrat. Diese erhöhte Fluoreszenz bzw. der Unterschied der Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors erfasst werden. Dabei ist der Anstieg der Fluoreszenz proportional zur proteolytischen Aktivität. Durch die Umsetzung des Substrats in den Untersuchungsproben kann somit auf eine proteolytische bzw. MMP-Aktivität geschlossen werden. Die erhaltenen Messwerte der Fluoreszenzmessung werden in *Relativen Fluoreszenzeinheiten (RUF)* angegeben.

Die *Gelatine DQ™* hat als Substrat eine geringe Eigenfluoreszenz (*Product Information, Molecular Probes*), die allerdings bei der Erstellung der Standard-Kurven für die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte beachtet werden sollte (*Product Information, Molecular Probes*).

3.2.2 Prinzip der Fluoreszenzmessung

Das Verfahren der Fluoreszenzmessung beruht auf einem photometrischen Messprinzip, welches auf der Erfassung der durch Fluoreszenz entstehenden Lichtstrahlung beruht.

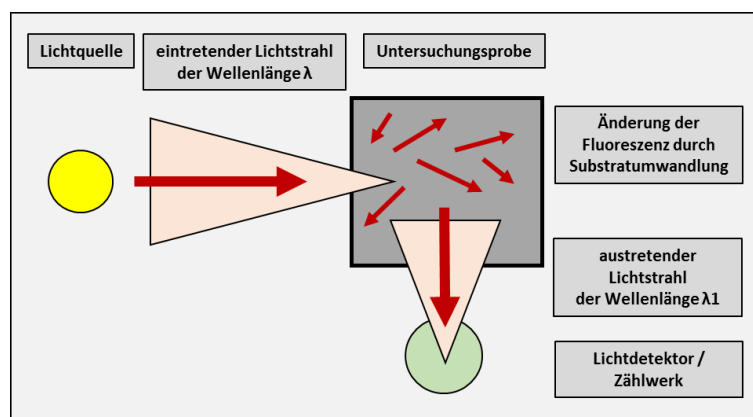


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmessung; das einfallende Licht der Wellenlänge λ wird durch die fluoreszierende Substanz in der Probe umgewandelt in das Licht der Wellenlänge λ_1 , die dann von einem Lichtdetektor gemessen werden kann

Die Abbildung 9 zeigt schematisch das Prinzip der Fluoreszenzmessung durch eintretendes und austretendes Licht. Das Licht mit einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt die Probe, welche die fluoreszierende Substanz enthält. Diese wandelt einen Teil des einfallenden Lichtes einer bestimmten Wellenlänge in ein Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge um. Das so erzeugte Licht strahlt in alle Richtungen und kann mit einem entsprechenden Detektor gemessen werden.

3.3 Versuchsplanung und Durchführung

3.3.1 Versuchsplanungen für die Enzymaktivitätsmessungen

In der Literatur sind momentan nur Studien (*Pashley et al., 2004; Nishitani et al., 2006*) beschrieben, die sich mit dem Nachweis einer kollagenolytischen und gelatinolytischen Aktivitätstestung am Dentinpulver beschäftigen. Es konnten keine Studien gefunden werden, die sich mit einer Testung enzymatischer Aktivität am Dentin-Hartmaterial beschäftigt haben oder solche, die die Methode genauer beschreiben. In erster Linie ging es darum, die in der Literatur beschriebene Testung auf eine mögliche MMP Aktivität am Dentinpulver so zu modifizieren, dass sie auch für eine Testung am Dentin-Hartmaterial verwendet werden konnte. Die nachfolgende Abbildung 10 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf.

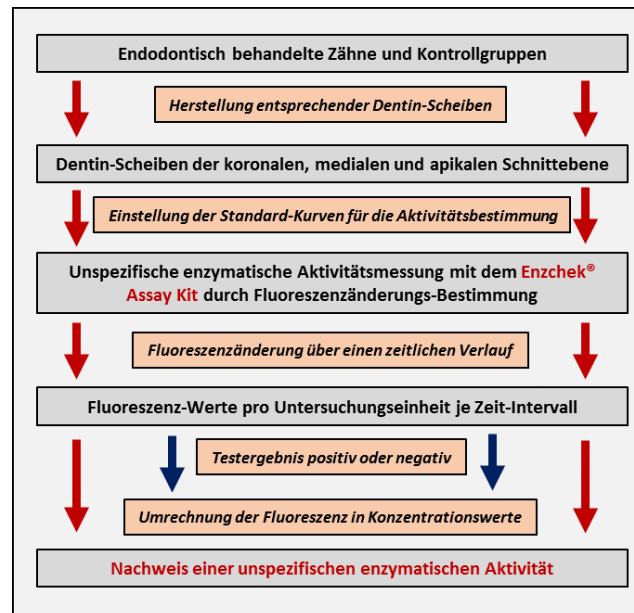


Abbildung 10: Darstellung der Versuchsplanung und Verfahrensweise der enzymatischen Aktivitätsmessung am Wurzel-Dentin-Hartmaterial

So wurde für die experimentellen Versuche dieser Studie ebenfalls der kommerziell erhältliche Enzymtest EnzChek® verwendet. Dazu musste als *erstes* die Methodik der EnzChek®-Testung an die Verwendung mit Hartmaterial angepasst werden. Als *zweites* mussten entsprechende Standards pipettiert werden, die es ermöglichten die zur Berechnung einer enzymatischen Aktivität notwendigen Standard-Kurven in den entsprechenden Messbereich zu bekommen. Mit dieser Versuchsanordnung sollte in erster Linie die Frage nach dem Vorhandensein einer kollagenolytischen und gelatinolytischen Aktivität abgeklärt werden. Gleichfalls rückte die Fragestellung nach eventuellen Unterschieden einer vorhandenen enzymatischen Aktivität in den einzelnen Untersuchungsebenen (*koronal, mittel und apikal*) in den Focus. Dabei sollten die einzelnen Untersuchungsebenen in einer Probe untereinander, sowie mit denen der Kontrollgruppen analytisch verglichen werden.

Die hier skizzierte Versuchsplanung diene somit einer ersten Orientierung im Hinblick auf detaillierte Erkenntnisse, ob unspezifische enzymatische Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne auch am Dentin-Hartmaterial getestet und nachgewiesen werden kann.

3.3.2 Versuchsplanungen für die Testung der Lagerungsmedien

Für die Versuche zur enzymatischen Testung eines eventuellen Einflusses des Lagerungsmediums auf die zu messende proteolytische Aktivität an den Dentin-Scheiben wurden normales Leitungswasser (H_2O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige und 1%ige Thymollösung verwendet. Als weitere Lagerungsmethode wurde eine Tiefkühlung der entsprechenden Präparate bei $-28^{\circ}C$ getestet. Dazu wurden einzelne Dentin-Scheiben als entsprechendes Untersuchungsmaterial, wie schon beschrieben, gefertigt.

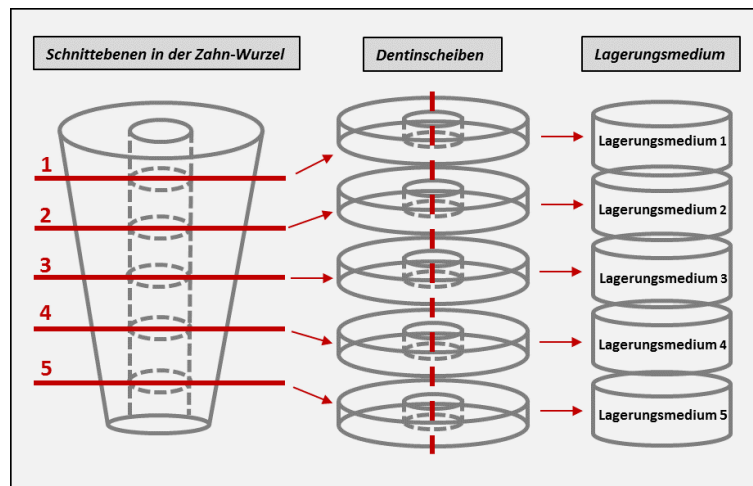


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Gewinnung und Lagerung der Dentin-Scheiben für den Versuchsansatz 1 und 2 für die enzymatischen Aktivitätstestungen nach Lagerung im entsprechenden Medium

Insgesamt sollten fünf Lagerungsmedien in der Testreihe verwendet werden. Für einen ersten Versuchsansatz sind aus je einer Zahnwurzel fünf Dentin-Scheiben geschnitten worden, die dann jeweils auf die einzelnen Lagerungsmedien aufgeteilt wurden. Die Aufteilung der Dentin-Scheiben auf die Lagerungsmedien erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Der Lagerungszeitraum für diese Proben wurde auf 65 Tage angesetzt. Für einen zweiten Versuchsansatz wurden, wie beschrieben, Kompletzzähne den Lagerungsmedien zugeführt. Diese wurden ebenfalls über einen Zeitraum von 65 Tagen gelagert. Nach Ende der Lagerungszeit wurden die Zähne ebenfalls zu Dentin-Scheiben verarbeitet und der enzymatischen Testung zugeführt. Die entsprechenden Proben die in der Tiefkühlung gelagert waren, wurden trocken, also ohne den Zusatz von Wasser oder ähnlichen Substanzen bei $-28^{\circ}C$ tiefgekühlt. Für jeden Versuchsansatz wurden so 25 Dentin-Scheiben, also insgesamt 50 Dentin-Scheiben zur enzymatischen Testung bereitgestellt.

3.3.3 Labortechnische Durchführung der EnzChek®-Methode

Für die enzymatische Testung wurden das Kit EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit* der Firma *Molecular Probes®* mit den Nummern *REF E12055* und *LOT 1543434* sowie *LOT 1644683* verwendet. In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Einzelproben aus den *Eppendorf-Tubes* kommend in entsprechende *24 Well Cell Culture Platten* übertragen. Dabei wurde auf je ein Well eine zu untersuchende Dentinscheibe verteilt. Diese Platten mit einem relativ großen Volumen pro Well fungierten als Arbeitsplatten. Im Folgenden wurden die einzelnen Well's mit je 1000 µl d-H₂O aufgefüllt und die Dentin-Scheiben einem ersten Waschgang zur Beseitigung letzter Thymollösungsreste zugeführt. Die Reinigung erfolgte über einen Zeitraum von 10 min. Zur Intensivierung der Reinigungswirkung wurde der Waschvorgang auf einem Rüttler *Vortex Genie 2* der *Firma Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)* bei einer Schüttelfrequenz von 10 rpm durchgeführt, auf welchem die Platten in einer speziellen Halterung gelagert wurden.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Dentinscheiben zur Freilegung der einzelnen Kollagenfibrillen aus dem dreidimensionalen Kollagengeflecht und zur Aktivierung der im Dentin eingebundenen MMP's entmineralisiert bzw. geätzt. Dazu wurde das d-H₂O aus den einzelnen Wells entfernt und dann je mit 1000 µl 0,5 M EDTA-Lösung wieder aufgefüllt. Die Scheiben wurden insgesamt über einen Zeitraum von 10 min bei Raumtemperatur de- bzw. entmineralisiert. Zur Unterstützung der Entmineralisierungswirkung, wurden die Well's wieder auf dem Rüttler bei einer Schüttelfrequenz von 10 rpm gelagert. Nach erfolgreicher Demineralisierung wurden die Dentin-Scheiben mit je 1000 µl d-H₂O auf dem Rüttler bei Raumtemperatur und einer Schüttelfrequenz von 10 rpm über einen Zeitraum von 10 min gewaschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 Mal wiederholt.

Die so entmineralisierten Einzelproben (Dentin-Scheiben) wurden danach in die Messkavitäten einer 96-Well-Mikroplatte (*Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol*) verteilt.

Nach Vorbereitung und Verteilung der Untersuchungsproben wurden nun die Reaktionslösungen für die Durchführung des Gelatinase / Collagenase Assay Kits vorbereitet. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung der DQ™-Gelatine hergestellt, indem der im Kit enthaltenen DQ™-Trockensubstanz 750 µl d-H₂O hinzugefügt wurde. Um die DQ™-Gelatine-Lösung über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden der Gesamtlösung zusätzlich noch 250 µl 0,05%ige Natrium-Azid-Lösung hinzugefügt. Aus dem ebenfalls im Kit enthaltenen Reaktionspuffer wurde eine Arbeits-Lösung hergestellt, indem 2 ml der Stock-Lösung mit insgesamt 18 ml d-H₂O verdünnt bzw. vermischt wurden. Nachdem die Dentinscheiben auf die Messkavitäten verteilt worden sind, wurden die Wells jeweils mit 80 µl Reaktionspuffer und 20 µl DQ™-Gelatine-Lösung zur Enzymaktivitätsmessung gefüllt und gut durchgemischt. Da jedoch eine sehr geringe oder eventuell auch gar keine Enzymaktivität erwartet werden

konnten, mussten für die enzymkatalisierten Fluoreszenzmessungen ideale körperähnliche Temperaturen geschaffen werden. Aus diesem Grund erfolgten die Fluoreszenzmessungen an den Dentin-Scheiben aller Untersuchungsgruppen und der Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Lagerungsmedien bei einer Temperatur von 37°C. Die Lösungen und die entmineralisierten Dentinscheiben wurden daher vor der Messung bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Enzymaktivität, die durch eine Veränderung der entsprechenden Fluoreszenz-Werte angezeigt wurde.

Die Messungen der Fluoreszenzwerte erfolgten mit dem EnzChek®-System zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$, $t = 30 \text{ min}$, $t = 60 \text{ min}$ und 120 min nach erfolgter zweistündiger Inkubation, die die biochemische Reaktion initialisieren sollte. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Messplatten jeweils im Messgerät gelagert, welches die Temperatur im Meßraum exakt bei 37°C gehalten hat. Die fluoreszenzmarkierten Spaltprodukte der DQ™ Gelatinase haben ihr Absorptionsmaximum bei 495 nm und ihr Fluoreszenz-Emissionsmaximum bei 515 nm. Die enzymatischen Aktivitätsmessungen erfolgten im Forschungslabor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes. Für die Fluoreszenzmessungen in dieser Untersuchung wurde ein Fluoreszenzdetektor GENios der Firma Tecan® (Salzburg, S, Austria) Firmware V4.62-07/01 GENios Serial number 12900400253 unter Zuhilfenahme der Software Tecan-i-control 1.10.4.0 verwendet.

Die nachfolgende Tabelle 4 gibt noch einmal einen Überblick der verwendeten Materialien und Lösungen aus dem EnzChek® Assay Kit.

Tabelle 4: Packungsinhalt des EnzChek® Gelatinase / Collagenase Assay Kit der Firma Molecular Probes®

Bezeichnung / Lösung / Substanz	Hersteller / Firma Stadt / Land
EnzChek® Gelatinase / Kollagenase Assay Kit bestehend aus:	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
1. DQ™ Gelatine aus der Schweinehaut, Fluorescein konjugiert (fluoreszierender Farbstoff aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe, pH-abhängige Fluoreszenzaktivität) Inhalt 1 mg Substrat	
2. Reaktionspuffer: 50 ml 0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl 50 mM CaCl ₂ ; 2 mM Sodium Acid; pH 7,6	
3. Kollagenase Typ IV von Clostridium histolyticum 500 U U wird dabei als Menge an Enzym definiert welche 1 µmol L-Leucin-Äquivalent von Kollagen befreit in 5 h bei 37 °C und pH 7,5	

Folgende Einstellungen am Fluoreszenzdetektor wurden für die Untersuchungen gewählt:

- Modus. Fluoreszenz Messung von oben
- Excitations-Wellenlänge: 485 nm
- Emission-Wellenlänge: 535 nm
- Emission-Bandbreite: 9 nm

- Verstärkung (Manual): 50
- Anzahl der Blitze: 10
- Verzögerungs-Zeit: 0 μ s
- Integrations-Zeit: 20 μ s
- Ruhe-Zeit: 0 μ s
- Platten-Definition: GRE96 fb.pdf

3.3.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität pro Dentinanteil

In einem ersten Schritt wurde das Gewicht der einzelnen Dentin-Scheiben, die für die jeweiligen enzymatischen Untersuchungen verwendet wurden, bestimmt. Dazu wurde eine elektronische Waage vom *Typ CP 423 S der Firma Sartorius AG Göttingen* verwendet. Die Gewichtsangaben dienen als Grundlage und Voraussetzung, um die gemessenen gelatinolytischen und kollagenolytischen enzymatischen Aktivitäten pro Dentinanteil berechnen zu können. Die enzymatische Aktivität pro bestimmten Dentinanteil ist für die statistische Auswertung und die Vergleichbarkeit der einzelnen unterschiedlichen Untersuchungsgruppen untereinander und miteinander von entscheidender Bedeutung.

In einem zweiten Schritt wurden die Standard-Kurven berechnet, mit deren Hilfe die gemessenen Fluoreszenzwerte der einzelnen Untersuchungsproben in die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten der Proben umgerechnet werden konnten. Zuletzt wurde die gemessene enzymatische Aktivität, in unserer Untersuchung, in μ U pro mg Dentin aus den vorher ermittelten Daten berechnet, um die einzelnen Untersuchungsergebnisse statistisch auswerten und miteinander vergleichen zu können.

3.3.5 Einstellungen und Festlegungen der Standard-Kurven

Die mit dem EnzChek® Assay Kit E12055 mitgelieferten Lösungen und Substanzen zur Herstellung einer Standard-Lösung wurden in einem ersten Schritt verdünnt. Diese Verdünnung diente dazu, den Messbereich des Testverfahrens für eine zu erwartende geringe Enzymkonzentration sensibel zu gestalten.

Die Standard-Collagenase Typ IV vom *Clostridium histolyticum* der Testpackung hatte eine Konzentration von 500 U (Units) pro 500 μ l, d.h. 1 U pro ml. Vorversuche führten zu der Annahme, dass der Messbereich der enzymatischen Aktivität bei den Versuchsreihen im Bereich von 0 bis 200 μ U zu liegen schien. Auf diesen zu erwartenden Messbereich wurden die Standard-Lösungen, die zur Erstellung der einzelnen Standard-Kurven dienen sollten, eingestellt. Dazu wurden 10 μ l der im Kit enthaltenen Collagenase mit 1990 ml d-H₂O gemischt. Die so erhaltene Grund-Standard-Lösung (SG) hatte eine Konzentration von 200 μ U/ μ l. Aus dieser Grundlösung wurde entsprechend der folgenden Pipettierreihe,

dargestellt in Tabelle 5, eine Standard-Reihe S1 bis S17 inklusive einer Null-Probe B0 hergestellt. Diese einzelnen Lösungen konnten so entsprechend der Pipettierung auf definierte Konzentrationswerte eingestellt werden.

Tabelle 5: Pipettier- und Verdünnungsreihe der Standard-Lösungen S1 bis S17 und B0 für die Standard-Kurve

	SG in μl	dH2O in μl	Gesamt Volumen in μl	Konzentration in μU
S1	200	0	200 μl	200
S2	175	25	200 μl	175
S3	150	50	200 μl	150
S4	125	75	200 μl	125
S5	100	100	200 μl	100
S6	75	125	200 μl	75
S7	50	150	200 μl	50
S8	25	175	200 μl	25
S9	20	180	200 μl	20
S10	15	185	200 μl	15
S11	10	190	200 μl	10
S12	5	195	200 μl	5
S13	2,5	197,5	200 μl	2,5
S14	2	198	200 μl	2
S15	1,5	198,5	200 μl	1,5
S16	1	199	200 μl	1
S17	0,5	199,5	200 μl	0,5
B0	0	200	200 μl	0

Nach dem in der Abbildung 12 dargestellten Schema wurden die Lösungen mit vorbestimmter Konzentration in die entsprechenden Untersuchungswells pipettiert.

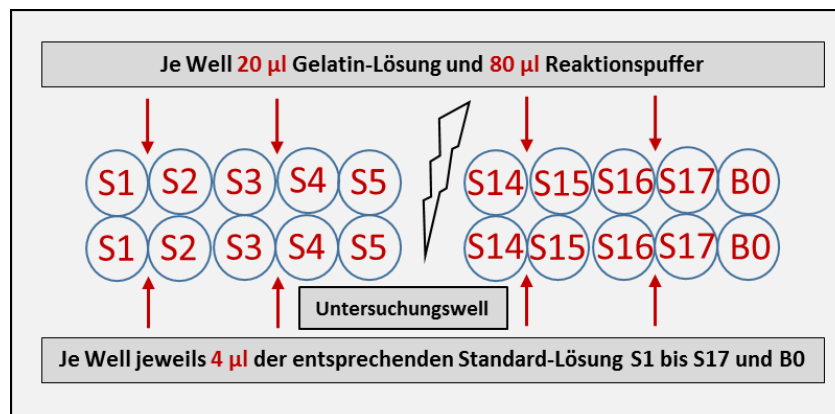


Abbildung 12: Schema der Pipettierung der Standard-Lösungen pro Untersuchungs-Well für die Fluoreszenzmessung

Nach der Pipettierung der Lösungen in die entsprechenden Untersuchungswells erfolgten die Inkubation und die entsprechenden Fluoreszenzmessungen. Diese wurden zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ (sofort nach Inkubation), $t = 30 \text{ min}$, $t = 60 \text{ min}$ und $t = 120 \text{ min}$ durchgeführt. Um eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurden die Standard-Lösungen S1 bis S17 und B0 jeweils doppelt pipettiert. Bei der späteren Berechnung der Konzentrationswerte wurde jeweils mit dem gebildeten Mittelwert der Standards gerechnet.

Da das im Test verwendete Substrat eine geringe Eigenfluoreszenz aufwies wurde der Mittelwert der Null-Probe (*B0*) von den Mittelwerten der jeweiligen Standards (*S1 bis S17*) abgezogen. Die entsprechenden Mittelwerte wurden für jeden Messzeitpunkt zur graphischen Auswertung in ein Diagramm übertragen. Mit Hilfe der einzelnen Punkte aus der Diagrammdarstellung wurde mathematisch durch das Tabellenkalkulationsprogramm *Excel 2013* der *Firma Microsoft, Seattle, WA, USA* eine Trendlinie berechnet. Anhand der geometrischen Ausprägung dieser Trendlinie wurde ebenfalls durch das Tabellenkalkulationsprogramm eine mathematische Formel errechnet, mit welcher die entsprechenden xy-Wertepaare bestimmt werden konnten. In diesem Fall wurden mit der Formel die gemessenen Fluoreszenzwerte in die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten umgerechnet.

Neben der mathematischen Formel für die Berechnung der entsprechenden Konzentrationswerte wurde der R^2 -Wert, das sogenannte Bestimmtheitsmaß, berechnet. Der R^2 -Wert gibt die Genauigkeit, d.h. den entsprechenden Abstand der einzelnen Mess-Werte in Bezug auf die Trendlinie an. Je näher dieser Wert an 1 liegt oder 1 ist, desto mehr bzw. näher liegen die Mess-Werte auf der gebildeten Trendlinie.

3.4 Statistische Auswertung der Versuche

Die gesammelten Daten wurden in entsprechenden Tabellen (*6 bis 34*) erfasst und mit Hilfe des Statistikprogramms *SPSS Statistics 23.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)* ausgewertet und analysiert. Es erfolgte dabei eine Berechnung und Erfassung der jeweiligen Mittelwerte mit dementsprechender Standardabweichung. Die Messwerte wurden mit dem *Shapiro-Wilk-Test* auf Normalverteilung geprüft. Der Vergleich der einzelnen Schnittebenen erfolgte mit dem *gepaarten T-Test*. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der endodontisch behandelten Zähne wurden gegen die nicht endodontisch behandelten und noch nicht durchgebrochenen Zähne mittels *ungepaartem T-Test* statistisch geprüft. Entsprechend der Aufgabenstellung wurden für die Nullhypothesen keine Unterschiede der proteolytischen Aktivitäten, sowohl innerhalb der Zähne, als auch im Vergleich der endodontisch und nicht endodontisch behandelten Zähne angenommen. Für die Ablehnung der Nullhypothese wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ definiert.

4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse für die enzymatischen Aktivitätsbestimmungen der jeweiligen Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2 und UG 3) und die Ergebnisse der Versuche mit den Lagerungsmedien systematisch dargestellt.

4.1 Standard-Kurven

Mit der durchgeführten enzymatischen Messung anhand der EnzChek®-Methode wurden Unterschiede in der Fluoreszenzintensität innerhalb der einzelnen Untersuchungswells über einen definierten Zeitraum gemessen. Diese Unterschiede wurden durch eine Umsetzung des verwendeten Substrates, d.h. dessen Aufspaltung erzeugt, indem die Spaltprodukte eine höhere Fluoreszenz als das Ausgangssubstrat aufwiesen. Eine Umsetzung von Substrat, deutet diesbezüglich auf enzymatische Aktivität hin. Um die erhaltenen Fluoreszenzwerte in enzymatische Aktivität, d.h. Konzentrationswerte umrechnen zu können, wurde primär für jeden einzelnen Mess-Zeitpunkt eine Standard-Kurve erstellt.

4.1.1 Konzentrationsbereich der Standard-Kurven

Für die Berechnung der enzymatischen Aktivität mit Hilfe der Standardkurven durch einzelne xy-Wertepaare wurde der Konzentrationsbereich durch die Standardlösungen S1 bis S17 und B0 auf Werte zwischen 0 und 200 μU eingestellt.

4.1.2 Trendlinien und R^2 -Wert der Standard-Kurven

Die durch die Standardkurven generierten Trendkurven zeigten alle einen polynomischen Verlauf. Diese Trendlinien bildeten einen wichtigen Bestandteil der jeweiligen mathematischen Auswertung der entsprechenden Mess-Werte. Die jeweiligen R^2 -Werte (*Bestimmtheitsmaß*) in allen Standard-Kurven-Berechnungen lagen bei den durchgeführten Versuchsreihen mit ihren Werten zwischen 0,9875 und 0,9983.

4.1.3 Standard-Kurven für die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte

Nach Festlegung der einzelnen Pipettiermengen und der entsprechenden Konzentrationsbereiche der Standardlösungen für die enzymatischen Testungen der Proben aller Untersuchungsgruppen und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien, war es als erstes wichtig, einheitliche Standard-Kurven zu bestimmen, mit welchen die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte erfolgen konnte. Da die Messergebnisse mit der EnzChek®-Methode insgesamt über einen Zeitraum von $t = 0$ min, also sofort nach einer zweistündigen

Inkubationszeit, bis $t = 120$ min nach Inkubation bestimmt wurden, musste auch für jeden einzelnen Mess-Zeitpunkt eine separate Standard-Kurve erstellt und berechnet werden. In der folgenden Tabelle 6 sind die Fluoreszenz-Mess-Werte der pipettierten Standardlösungen S1 bis S17 und der B0-Probe (Lösungen definierter Konzentration) für alle Messzeiten dargestellt.

Tabelle 6: Fluoreszenz-Mess-Werte der Standard-Lösungen S1 bis S17 und B0 in RUF für die Berechnung der enzymatischen Konzentrationswerte aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min

Standard-Lösung	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Konzentration in μU	200	175	150	125	100	75	50	25	20
Messreihe 1 ($t = 0$ min)	21333	20780	20050	18741	17583	14703	9897	6584	5826
Messreihe 2 ($t = 0$ min)	21402	20883	19607	18655	17485	13749	10785	6248	5249
MW der Messungen	21367,5	20831,5	19828,5	18698	17534	14226	10341	6416	5537,5
Messreihe 1 ($t = 30$ min)	21091	20848	20233	19053	18038	15336	10631	7155	6341
Messreihe 2 ($t = 30$ min)	21480	21046	19912	19037	18023	14531	11555	6950	5746
MW der Messungen	21285,5	20947	20072,5	19045	18030,5	14933,5	11093	7052,5	6043,5
Messreihe 1 ($t = 60$ min)	20980	20716	20191	19071	18372	15907	11301	7715	6822
Messreihe 2 ($t = 60$ min)	21403	21029	20028	19266	18334	15191	12246	7519	6209
MW der Messungen	21191,5	20872,5	20109,5	19168,5	18353	15549	11773,5	7617	6515,5
Messreihe 1 ($t = 120$ min)	20975	20778	20289	19365	19011	16828	12722	8960	7952
Messreihe 2 ($t = 120$ min)	21555	21319	20616	19858	19219	16542	13777	8812	7301
MW der Messungen	21265	21048,5	20452,5	19611,5	19115	16685	13249,5	8886	7626,5
Standard-Lösung	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	Blank
Konzentration in μU	15	10	5	2,5	2	1,5	1	0,5	0
Messreihe 1 ($t = 0$ min)	4594	2533	1975	1441	1353	1248	1188	1093	1015
Messreihe 2 ($t = 0$ min)	4303	2447	1956	1444	1340	1248	1170	1100	1005
MW der Messungen	4448,5	2490	1965,5	1442,5	1346,5	1248	1179	1096,5	1010
Messreihe 1 ($t = 30$ min)	4990	2700	2064	1497	1382	1264	1201	1091	992
Messreihe 2 ($t = 30$ min)	4777	2625	2067	1479	1363	1256	1171	1096	990
MW der Messungen	4883,5	2662,5	2065,5	1488	1372,5	1260	1186	1093,5	991
Messreihe 1 ($t = 60$ min)	5385	2873	2164	1510	1392	1268	1191	1077	962
Messreihe 2 ($t = 60$ min)	5155	2794	2165	1510	1386	1261	1165	1070	957
MW der Messungen	5270	2833,5	2164,5	1510	1389	1264,5	1178	1073,5	959,5
Messreihe 1 ($t = 120$ min)	6288	3324	2422	1663	1493	1326	1227	1073	936
Messreihe 2 ($t = 120$ min)	6103	3230	2435	1639	1478	1316	1192	1072	930
MW der Messungen	6195,5	3277	2428,5	1651	1485,5	1321	1209,5	1072,5	933

Stellvertretend sind im Folgenden die Messergebnisse und Berechnungen für die Erstellung der Standard-Kurve, sowie der entsprechenden Untersuchungsgruppen jeweils zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min nach erfolgter zweistündiger Inkubation dargestellt.

Da alle pipettierten Lösungen in den entsprechenden Untersuchungswells der Mess-Platte eine gewisse eigene Fluoreszenz aufwiesen wurde eine B0 oder Blank-Probe mitgeführt. Diese gibt die Eigenfluoreszenz der verwendeten Lösungen, insbesondere der verwendeten DQ™-Gelatine-Lösung an und wurde zur Ermittlung der Fluoreszenzwerte mit denen die Graphiken zur Standard-Kurve erstellt und berechnet wurden, mathematisch abgezogen. Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt die errechnete Standard-Kurve zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min. Die übrigen und Graphiken zu den Standard-Kurven der anderen Mess-Zeiten finden sich zur Ansicht im Anhang.

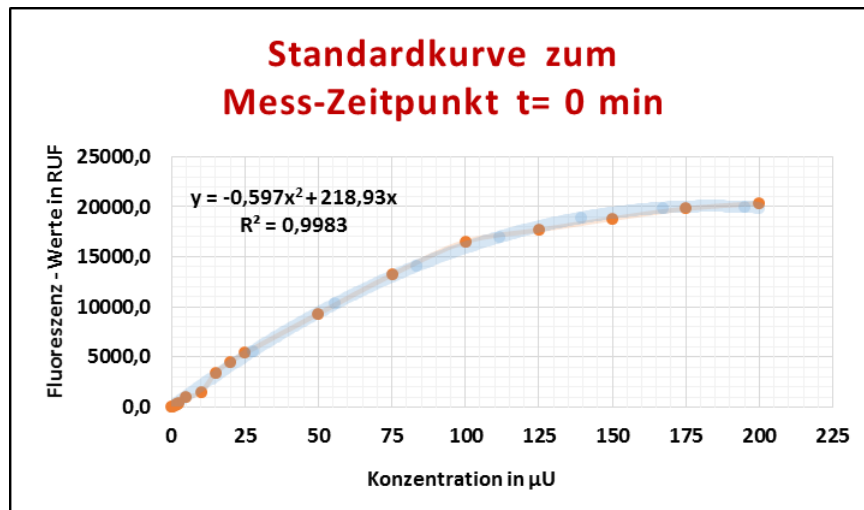


Abbildung 13: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau-ermittelte Trendlinie)

4.2 Untersuchung der endodontisch behandelten Zähne (UG 1)

Die Auswertung der Ergebnisse des EnzChek®-Testes dieser Untersuchungsgruppe mit den entsprechenden Fluoreszenz-Werten, sowie den daraus errechneten enzymatischen Aktivitätswerten und den daraus resultierenden Graphiken und Tabellen erfolgten jeweils für alle Mess-Zeiten des gesamten Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min.

4.2.1 Gewicht der Proben (UG 1)

Für die Berechnung und Bestimmung der relativen enzymatischen Aktivität pro Dentinanteil wurden alle Dentinscheiben vor der Untersuchung EnzChek®-Testes gewogen.

Tabelle 7: Auflistung der Gewichtsangaben der Dentin-Scheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne), Angaben in mg

UG1 Proben- Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Gewicht je Schnittebene
koronale Dentin- Scheibe	32	38	44	35	40	47	29	35	46	33	37,9
mediale Dentin- Scheibe	31	33	38	33	38	51	28	30	39	32	35,3
apikale Dentin- Scheibe	28	30	33	30	24	65	22	32	37	23	32,4
MW - Gewicht je Probe	30,3	33,7	38,3	32,7	34,0	54,3	26,3	32,3	40,7	29,3	35,2

Die Dentin-Scheiben der koronalen Schnittebene aller Proben der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne hatten im Mittel ein Gewicht von 37,9 mg, während die der medialen Schnittebene im Mittel 35,3 mg und die der apikalen Schnittebene im Mittel 32,4 mg wogen. Die Dentin-Scheiben der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) hatten im Gesamtmittelwert ein Gewicht von 35,2 mg je Probe.

4.2.2 Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 1)

Entsprechend der durch die Standard-Kurven ermittelten Umrechnungsformeln (4.1.3), wurden die durch die EnzChek®-Messung generierten Fluoreszenz-Werte in die entsprechenden enzymatischen Aktivitätswerte umgerechnet.

Tabelle 8: Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt t = 0 min generiert wurden

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Fluoreszenz je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	1263	1278	1578	1110	1038	2194	1043	1043	1114	1057	1271,8
mediale Dentin-Scheibe	1134	1069	1262	1000	940	1994	994	1202	1262	1519	1237,6
apikale Dentin-Scheibe	1069	1158	1109	972	920	1304	954	937	1455	1116	1099,4
MW - Fluoreszenz je Probe	1155,3	1168,3	1316,3	1027,3	966,0	1830,7	997,0	1060,7	1277,0	1230,7	1202,9

Die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte erfolgte separat für alle Werte der einzelnen Mess-Zeitpunkt von t = 0 min bis t = 120 min. Exemplarisch ist dieses Vorgehen wieder für den Mess-Zeitpunkt t = 0 min nach erfolgter Inkubation, dargestellt und beschrieben. Die Tabellen der Werte der anderen Mess-Zeitpunkte befinden sich zur Ansicht im Anhang.

Anhand der Formel $y = -0,597 x^2 + 218,93 x$ für den Mess-Zeitpunkt t = 0 min wurden mit Hilfe der gemessenen Fluoreszenzwerte die enzymatischen Aktivitätswerte mit einer mathematisch generierten Rechenkette durch das Tabellenkalkulationsprogramm *Excel 2013* als x-Wert bestimmt.

Um die Werte statistisch miteinander vergleichbar und auswertbar zu gestalten, wurde in einem letzten Rechenschritt anhand der vorher bestimmten Gewichtswerte der einzelnen Dentin-Scheiben die relative enzymatische Aktivität in μU pro mg Dentin ermittelt. Die Ergebnisse sind für den Mess-Zeitpunkt t = 0 min in der Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt t = 0 min

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	11,42	9,62	8,28	10,46	9,16	7,69	12,64	10,47	7,96	11,11	9,88
mediale Dentin-Scheibe	11,81	11,10	9,62	11,11	9,66	7,10	13,10	12,19	9,37	11,39	10,65
apikale Dentin-Scheibe	13,09	12,20	11,10	12,23	15,30	5,62	16,68	11,47	9,86	15,92	12,35
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	12,11	10,97	9,66	11,27	11,37	6,80	14,14	11,38	9,06	12,81	10,96

Analog zu der dargestellten Berechnung wurden die Werte für die anderen Mess-Zeitpunkte mit den durch die Standard-Kurven generierten folgenden Formeln bestimmt und berechnet:
 $t = 30 \text{ min}$ mit der Formel $y = -0,6796 x^2 + 234,14 x$, $t = 60 \text{ min}$ mit der Formel $y = -0,7505 x^2 + 246,62 x$ und $t = 120 \text{ min}$ mit der Formel $y = -0,8896 x^2 + 272,37 x$.

Um aber auch statistisch eine Aussage über das gesamte Wurzelentzahn je Probe (*nicht geschnittene Zahnwurzel*) treffen zu können und um einen graphischen Überblick über den Verlauf der enzymatischen Reaktion zu erhalten, wurden danach die Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivitätswerte der einzelnen Schnittebenen je Probe und Mess-Zeitpunkt gebildet.

Tabelle 10: UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$	12,11	10,97	9,66	11,27	11,37	6,80	14,14	11,38	9,06	12,81	10,96
Mess-Zeitpunkt $t = 30 \text{ min}$	11,37	10,31	9,08	10,59	10,68	6,37	13,28	10,69	8,51	12,02	10,29
Mess-Zeitpunkt $t = 60 \text{ min}$	10,85	9,83	8,66	10,09	10,19	6,07	12,67	10,19	8,11	11,46	9,81
Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$	10,10	9,15	8,06	9,40	9,48	5,60	11,79	9,48	7,53	10,64	9,12
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	11,11	10,07	8,86	10,34	10,43	6,21	12,97	10,44	8,30	11,73	10,05

Die sich aus Tabelle 10 ergebende Darstellung der Mittelwerte je Probe, in Abbildung 14 dargestellt, zeigt die Änderung der enzymatischen Aktivität über einen zeitlichen Verlauf von $t = 120 \text{ min}$ nach erfolgter Inkubation. Das dargestellte Liniendiagramm zeigt ein relativ auffälliges, aber auch gleichmäßiges Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität über den gesamten Mess-Zeitraum.

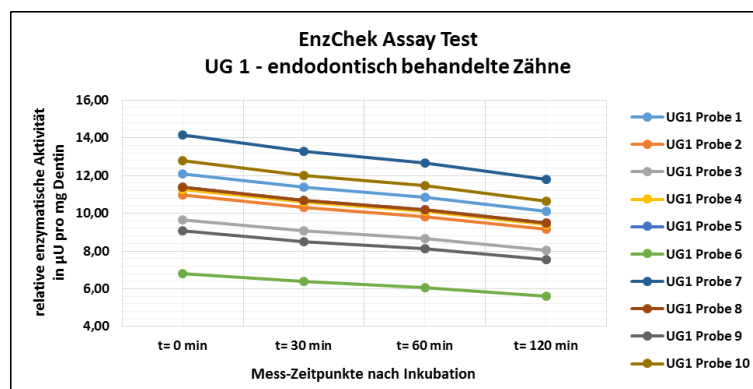


Abbildung 14: UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwert aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120 \text{ min}$ nach Inkubation

Während des Mess-Verlaufes zeigten sich deutlich Phasen unterschiedlicher enzymatischer Aktivität, welche zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ nach Inkubation einen Höhepunkt fanden und danach

kontinuierlich bis zum Zeitpunkt $t = 120$ min wieder abfielen. Dabei ist jedoch auffällig, dass der Abfall der enzymatischen Aktivität in allen Proben fast parallel verläuft, allerdings jedoch auf unterschiedlichen enzymatischen Aktivitätsniveaus. Dafür scheint die unterschiedliche Anzahl an aktivierten MMP's innerhalb der einzelnen Proben verantwortlich zu sein scheinen.

4.2.3 Vergleich der Schnittebenen: UG 1 (endodontisch behandelten Zähne)

Um detaillierte Aussagen und eventuelle Zusammenhänge über das Verhältnis der enzymatischen Aktivität zwischen den einzelnen Schnittebenen der Untersuchungsgruppe herzustellen zu können, wurde die Abbildung 15 zusammengestellt. Dazu wurden die Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivität ($\mu\text{U}/\text{mg}$) aller Einzelproben, je Schnittebene, für jeden einzelnen Mess-Zeitpunkt gebildet und im zeitlichen Messverlauf über einen Zeitraum von $t = 120$ min dargestellt.

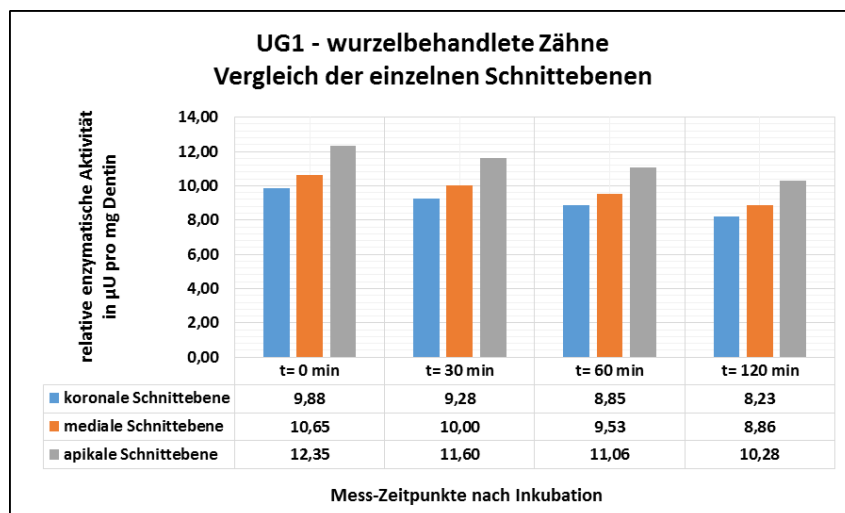


Abbildung 15: UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min

Betrachtet man die Balkengraphik in Abbildung 15, die die Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivität der einzelnen Schnittebenen der UG 1 im zeitlichen Verlauf darstellt, so lässt sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivitätswerte sowohl innerhalb der einzelnen Schnittebenen, als auch im Vergleich der einzelnen Schnittebenen, in Bezug auf die einzelnen Mess-Zeiten erkennen. Festzustellen ist eine Abnahme der enzymatischen Aktivitätswerte, gesehen innerhalb einer jeden Schnittebene (*koronal, medial, apikal*) mit zunehmendem Mess-Verlauf. Betrachtet man dagegen die enzymatischen Aktivitätswerte der unterschiedlichen Schnittebenen (*koronal, medial, apikal*) innerhalb der einzelnen Mess-Zeitpunkte zueinander, so zeigt sich eine Zunahme der enzymatischen Aktivität in allen Mess-Zeitpunkten von den koronalen zu den apikalen

Schnittebenen.

Dies bestätigen auch die entsprechenden Mittelwerte der enzymatischen Aktivität bezogen auf alle Mess-Zeitpunkte, die mit einem Wert von $9,06 \mu U$ pro mg Dentin für die koronale Schnittebene, mit $9,76 \mu U$ pro mg Dentin für die mediale Schnittebene und mit $11,23 \mu U$ pro mg Dentin für die apikale Schnittebene ermittelt wurden. Da alle Mess- und Datenwerte einer Normalverteilung (*Shapiro-Wilk-Test*) unterlagen, konnten sie mit dem *gepaarten T-Test* für *unabhängige Stichproben* einer statistischen Analyse unterzogen werden. Es konnte statistisch ein direkter Zusammenhang der Verteilung der enzymatischen Aktivität in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Aktivitätsänderung hergestellt werden. Zu allen Mess-Zeiten konnten zwischen der koronalen und der medialen Schnittebene ($p = 0,0079$ bis $p = 0,0084$), der koronalen und der apikalen Schnittebene ($p = 0,0067$ bis $p = 0,0072$) und zwischen der medialen und apikalen Schnittebene ($p = 0,0390$ bis $p = 0,0405$) signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

4.3 Untersuchung der nicht endodontisch behandelten Zähne (UG 2)

Die Auswertung der Ergebnisse des EnzChek®-Testes dieser Untersuchungsgruppe mit den entsprechenden Fluoreszenz-Werten, sowie den daraus errechneten enzymatischen Aktivitätswerten und den daraus resultierenden Graphiken und Tabellen erfolgten jeweils wiederum für alle Mess-Zeiten des gesamten Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min.

4.3.1 Gewicht der Proben (UG 2)

Parallel zur Auswertung und Berechnung der Ergebnisse in der UG 1 wurden auch für die UG 2 als erstes die Gewichtswerte der Dentin-Scheiben bestimmt.

Tabelle 11: Auflistung der Gewichtsangaben der Dentin-Scheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne), Angaben in mg

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Gewicht je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	41	43	40	49	43	32	34	32	42	39	39,5
mediale Dentin-Scheibe	38	35	35	36	32	32	31	30	38	36	34,3
apikale Dentin-Scheibe	34	32	33	34	39	31	28	29	30	28	31,8
MW - Gewicht je Probe	37,7	36,7	36,0	39,7	38,0	31,7	31,0	30,3	36,7	34,3	35,2

In der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne ergab sich im Gesamtmittelwert je Probe ein Gewichtswert von 35,2 mg. Der Mittelwert des Gewichts der Dentin-Scheiben der koronalen Schnittebene aller Proben betrug in dieser Gruppe 39,5 mg, während für die Proben der medialen Schnittebene ein Mittelwert des Gewichts von 34,3 mg und für die apikale

Schnittebene im Mittel ein Gewichtswert von 31,8 mg ermittelt wurde.

Die innerhalb der einzelnen Schnittebenen jeweils von koronal nach apikal abnehmenden Gewichtswerte sind der anatomisch konischen Wurzelform geschuldet, da bei der Herstellung der Untersuchungsproben besonders auf eine einheitliche Dicke der Dentin-Scheiben geachtet wurde.

4.3.2 Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 2)

Entsprechend der durch die Standard-Kurven ermittelten Berechnungsformeln (4.1.3), exemplarisch hier wieder für den Zeitpunkt $t = 0$ min durch die Formel $y = -0,597 x^2 + 218,93 x$ dargestellt, wurden die gemessenen Fluoreszenz-Werte in die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten umgerechnet und letztendlich anhand der Gewichtswerte der einzelnen Dentin-Scheiben die relative enzymatische Aktivität in μU pro mg Dentin bestimmt. Die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte erfolgte, wie bei den Werten der anderen Untersuchungsgruppen, separat für alle Werte der einzelnen Mess-Zeitpunkt von $t = 0$ min bis $t = 120$ min (Tab 13).

Tabelle 12: Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min generiert wurden

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Fluoreszenz je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	993	1068	1218	1397	1275	1029	1101	979	1221	1298	1157,9
mediale Dentin-Scheibe	898	976	1100	1191	1058	984	1054	973	1129	1184	1054,7
apikale Dentin-Scheibe	968	1009	1083	1038	1155	963	1095	929	1104	1060	1040,4
MW - Fluoreszenz je Probe	953,0	1017,7	1133,7	1208,7	1162,7	992,0	1083,3	960,3	1151,3	1180,7	1084,3

Tabelle 13: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	8,95	8,52	9,14	7,45	8,50	11,46	10,77	11,46	8,71	9,37	9,43
mediale Dentin-Scheibe	9,66	10,48	10,47	10,16	11,45	11,46	11,82	12,23	9,64	10,16	10,75
apikale Dentin-Scheibe	10,79	11,46	11,10	10,78	9,39	11,84	13,08	12,66	12,21	13,09	11,64
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	9,80	10,15	10,24	9,46	9,78	11,59	11,89	12,12	10,18	10,87	10,61

Um über das gesamte Wurzelndentin aller Schnittebenen einer Zahnwurzel eine Aussage treffen zu können, wurden aus den enzymatischen Einzelwerten einer Probe je Schnittebene die Mittelwerte, dargestellt in Tabelle 14, gebildet.

Tabelle 14: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0$ min bis $t = 120$ min

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min	9,80	10,15	10,24	9,46	9,78	11,59	11,89	12,12	10,18	10,87	10,61
Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min	9,21	9,54	9,62	8,89	9,19	10,88	11,17	11,38	9,57	10,22	9,97
Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min	8,78	9,10	9,17	8,48	8,76	10,38	10,65	10,86	9,12	9,74	9,50
Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min	8,17	8,47	8,54	7,89	8,15	9,66	9,91	10,10	8,49	9,07	8,84
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	8,99	9,32	9,39	8,68	8,97	10,63	10,91	11,11	9,34	9,97	9,73

Die graphische Darstellung der Mittelwerte der enzymatischen Aktivitäten der Proben der Untersuchungsgruppe 2, im Diagramm Abbildung 16 dargestellt, zeigt über den Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min nach Inkubation der Proben ein ähnliches strukturelles Verteilungsmuster der Enzymaktivitäten, wie bei den Proben der Untersuchungsgruppe 1. Über den gesamten zeitlichen Verlauf gesehen, zeigen sich deutlich Phasen unterschiedlicher enzymatischer Aktivität.

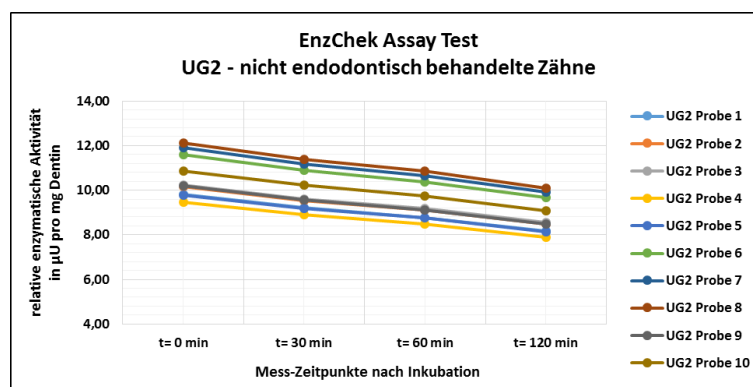


Abbildung 16: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwerte aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation

Dabei ist die enzymatische Aktivität zum Zeitpunkt $t = 0$ min in allen Proben am Höchsten. Sie fällt dann wiederum fast parallel bis zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min in allen Proben kontinuierlich ab.

4.3.3 Vergleich der Schnittebenen: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne)

Betrachtet man die Balkengraphiken in Abbildung 17 in welcher die Mittelwerte der entsprechenden relativen enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Schnittebenen zu den einzelnen Mess-Zeitpunkten dargestellt sind, so erkennt man in dieser Untersuchungsgruppe gegenüber der Untersuchungsgruppe 1 (Abb. 15) das gleiche Verteilungsmuster der

enzymatischen Aktivität im jeweiligen Schnittebenenvergleich. Es zeigen sich jeweils die höchsten enzymatischen Aktivitätswerte in der apikalen Schnittebene. Demgegenüber finden sich die niedrigsten enzymatischen Werte in der koronalen Schnittebene. Dieses Verteilungsmuster lässt sich für alle Mess-Zeitpunkte festlegen. So konnte im Mittel für die koronale Schnittebene eine enzymatische Aktivität von $8,86 \mu U$ pro mg Dentin, für die mediale im Mittel eine Aktivität von $9,86 \mu U$ pro mg Dentin und für die apikale Schnittebene im Mittel eine enzymatische Aktivität von $10,68 \mu U$ pro mg Dentin aus den vorhandenen Daten errechnet werden.

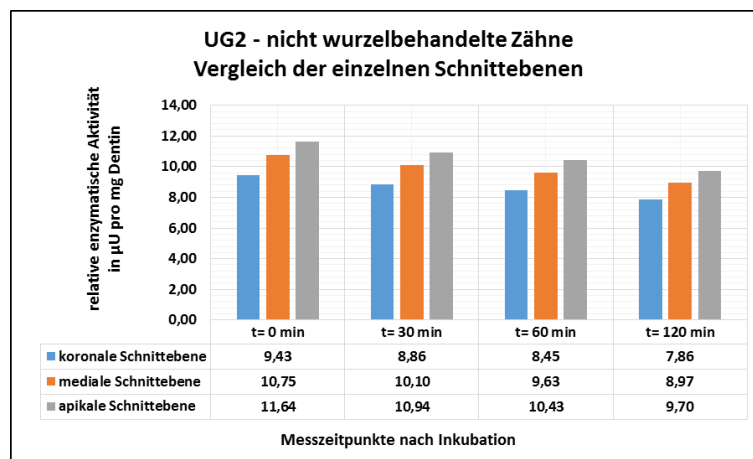


Abbildung 17: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min

Ein Zusammenhang der Verteilung der enzymatischen Aktivität in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Aktivitätsänderung zwischen den einzelnen Schnittebenen konnte statistisch nachgewiesen werden. Da alle Mess- und Datenwerte wiederum einer Normalverteilung (*Shapiro-Wilk-Test*) unterlagen, konnten sie mit dem *gepaarten T-Test* für *unabhängige Stichproben* einer statistischen Analyse unterzogen werden. So konnte in der Untersuchungsgruppe 2 der nicht endodontisch behandelten Zähne jeweils zwischen der koronalen und medialen Schnittebene mit ($p = 0,0016$) und der koronalen und der apikalen Schnittebene mit ($p = 0,0002$) zu den Mess-Zeitpunkten $t = 0$ min bis $t = 120$ min jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings zeigten sich beim Vergleich der Werte zwischen der medialen und apikalen Schnittebene zu allen Mess-Zeitpunkten keine eindeutigen statistischen Zusammenhänge. Die Werte lagen mit ($p = 0,0689$ bis $p = 0,0697$) knapp oberhalb des definierten statistischen Signifikanzniveaus.

4.4 Untersuchung der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne (UG 3)

Die Auswertung der Ergebnisse des EnzChek®-Testes dieser Untersuchungsgruppe mit den

entsprechenden Fluoreszenz-Werten, sowie den daraus errechneten enzymatischen Aktivitätswerten und den daraus resultierenden Graphiken und Tabellen erfolgten ebenfalls wieder für alle Mess-Zeiten des gesamten Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min.

4.4.1 Gewicht der Proben (UG 3)

In der Untersuchungsgruppe 3 (Zähne ohne Exposition in der Mundhöhle) betrug der Mittelwert des Gewichts aller Proben 34,4 mg. Für die Dentin-Scheiben der koronalen Schnittebene wurde ein Mittelwert von 41,5 mg gemessen, während für die mediale Schnittebene ein Mittelwert von 35,1 mg und für die apikale Schnittebene ein Mittelwert von 26,5 mg bestimmt werden konnte.

Tabelle 15: Auflistung der Gewichtsangaben der Dentinscheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 3 (Zähne ohne Exposition in der Mundhöhle), Angaben in mg

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Gewicht je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	33	48	51	43	41	40	41	42	34	42	41,5
mediale Dentin-Scheibe	32	46	42	39	30	29	36	32	32	33	35,1
apikale Dentin-Scheibe	30	30	30	26	20	22	29	24	30	24	26,5
MW - Gewicht je Probe	31,7	41,3	41,0	36,0	30,3	30,3	35,3	32,7	32,0	33,0	34,4

Ähnlich wie bei den anderen beiden Untersuchungsgruppen (1 und 2) ergaben sich aufgrund der anatomisch konischen Wurzelform abnehmende Gewichtswerte der Dentin-Scheiben innerhalb einer Probe von der koronalen zur apikalen Schnittebene.



Abbildung 18: Zähne der Untersuchungsgruppe 3; (a) kompletter noch nicht aufbereiteter Zahn; (b und c) aufbereitete Zahn Wurzeln mit Blick in das Wurzelkanallumen

Besonders auffällig bei vielen Proben, die in die UG 3 eingegliedert werden sollten, waren die im Durchmesser relativ großen und kurzen Wurzeln. Alle Zähne dieser Gruppe wiesen ein großlumiges Pulpencavum mit sehr breiten Wurzelkanälen auf.

Die Abbildung 18 verdeutlicht noch einmal bildlich den Größenunterschied eines aufbereiteten Wurzelkanallumens einer entsprechenden Probe, die in die UG 3 hätte eingegliedert werden sollten. Es bedurfte einigen Aufwandes und einiger Zeit, um geeignete Proben zu finden, die hinsichtlich des Wurzelkanallumens denen der Untersuchungsgruppen 1 und 2 entsprachen.

Letztendlich jedoch konnten annähernd gleiche Gewichtsproben generiert werden. Die Gewichtswerte der Proben der Untersuchungsgruppen 1 und 2 lagen im Mittel bei 35,2 mg, während die Werte für die Untersuchungsgruppe 3 im Mittel bei 34,4 mg lagen.

4.4.2 Fluoreszenz- und enzymatische Aktivitätswerte (UG 3)

Die Auswertung der Mess-Ergebnisse der Untersuchungsgruppe 3 erfolgte analog des Vorgehens der Auswertung der Untersuchungsgruppen 1 und 2. Die jeweilige Bestimmung der enzymatischen Aktivitätswerte aus den ermittelten Fluoreszenzwerten erfolgte, wie bei den Werten der anderen Untersuchungsgruppen, separat für jeden einzelnen Mess-Zeitpunkt von $t = 0$ min bis $t = 120$ min. Exemplarisch ist dieses Vorgehen wieder für den Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min, dargestellt und beschrieben. Die entsprechenden Werte sind in den Tabellen 16 und 17 dargestellt.

Tabelle 16: Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min generiert wurden

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - Fluoreszenz je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	3474	3010	2938	3511	3568	3230	3420	3290	3537	3463	3344,1
mediale Dentin-Scheibe	2819	3060	3126	2856	2957	2931	2938	3184	3094	3825	3079
apikale Dentin-Scheibe	2501	2626	2788	2535	2823	2717	2695	3141	3180	3258	2826,4
MW - Fluoreszenz je Probe	2931,3	2898,7	2950,7	2967,3	3116,0	2959,3	3017,7	3205,0	3270,3	3515,3	3083,2

Die Umrechnung der gemessenen Fluoreszenz-Werte in die entsprechenden enzymatischen Aktivitätswerte wurde, entsprechend der durch die Standard-Kurve ermittelten Berechnungsformel (4.1.3) $y = -0,597 x^2 + 218,93 x$ durchgeführt

Tabelle 17: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	10,76	7,44	7,01	8,25	8,65	8,91	8,67	8,48	10,43	8,46	8,71
mediale Dentin-Scheibe	11,20	7,76	8,49	9,18	11,92	12,34	9,94	11,14	11,15	10,71	10,38
apikale Dentin-Scheibe	11,99	11,97	11,95	13,83	17,91	16,31	12,37	14,86	11,88	14,84	13,79
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	11,32	9,06	9,15	10,42	12,83	12,52	10,33	11,49	11,16	11,33	10,96

Für die errechneten enzymatischen Aktivitätswerte wurden pro Untersuchungsprobe aus den einzelnen Schnittebenen die Mittelwerte je Mess-Zeitpunkt bestimmt. Diese sind wertemäßig in der Tabelle 18 und graphisch in der Abbildung 19 dargestellt.

Tabelle 18: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0$ min bis $t = 120$ min

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min	11,32	9,06	9,15	10,42	12,83	12,52	10,33	11,49	11,16	11,33	10,96
Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min	10,64	8,52	8,60	9,80	12,06	11,75	9,70	10,79	10,48	10,63	10,30
Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min	10,14	8,13	8,21	9,35	11,50	11,20	9,25	10,28	9,99	10,11	9,82
Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min	9,46	7,59	7,66	8,72	10,73	10,43	8,62	9,57	9,31	9,40	9,15
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	10,39	8,33	8,41	9,57	11,78	11,48	9,47	10,54	10,23	10,37	10,06

Die Analyse der graphischen Darstellung der Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivität pro mg Dentin der Untersuchungsgruppe 3 zeigt gegenüber den anderen beiden Untersuchungsgruppen im zeitlichen Verlauf über den gesamten Mess-Zeitraum gesehen ebenfalls das gleiche Verteilungsmuster. Unterschiede bestehen jedoch wieder im Niveau der enzymatischen Aktivität.

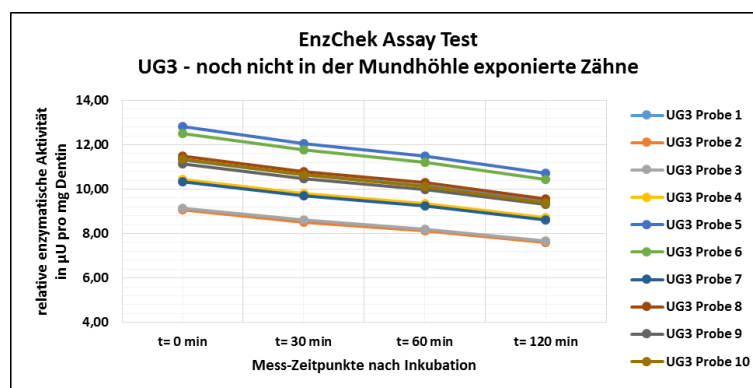


Abbildung 19: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwerte aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation

Die höchste enzymatische Aktivität findet sich wie bei den anderen Untersuchungsgruppen zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min nach Inkubation. Diese fällt dann kontinuierlich bis zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min in allen Proben parallel ab.

4.4.3 Vergleich der Schnittebenen: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne)

Die Abbildung 20 zeigt die Verteilung der enzymatischen Aktivität innerhalb der einzelnen Schnittebenen (*koronal*, *medial*, *apikal*) über den Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min anhand der gebildeten Mittelwerte. Auffallend gegenüber den anderen Untersuchungsgruppen ist in dieser Untersuchungsgruppe eine relativ hohe enzymatische Aktivität in den apikalen Schnittebenen. Im Vergleich zur koronalen Schnittebene ist sie fast doppelt so groß. Enzymatische Aktivitäten konnten über den gesamten Zeitverlauf der Fluoreszenzmessung

ermittelt werden.

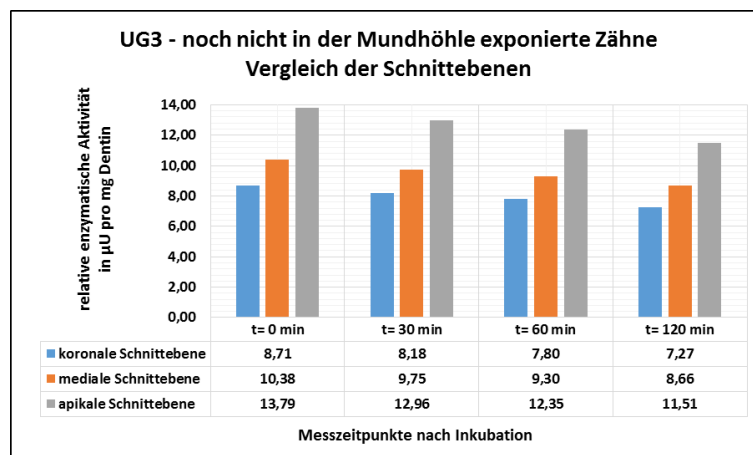


Abbildung 20: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - Graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min

Im Vergleich aller Schnittebenen und aller Mess-Zeitpunkte zeigte sich die höchste enzymatische Aktivität mit einem Mittelwert von $12,65 \mu\text{U}$ pro mg Dentin jeweils in der apikalen Schnittebene, wobei dies wertemäßig wieder auf die einzelnen Mess-Zeitpunkte bezogen mit $10,96 \mu\text{U}$ pro mg Dentin zum Zeitpunkt der ersten Messung nach der Inkubation $t = 0$ min am deutlichsten war. Ansonsten wurden im Mittel mit $7,99 \mu\text{U}$ pro mg Dentin in der koronalen Schnittebenen die geringsten enzymatischen Aktivitäten gemessen. Für die mediale Schnittebene konnte ein Wert von $9,52 \mu\text{U}$ pro mg Dentin ermittelt werden. Zwischen den Aktivitätsniveaus der koronalen und medialen Schnittebene mit ($p = 0,0013$), der koronalen und der apikalen Schnittebene mit ($p = 0,0001$) und der medialen und der apikalen Schnittebene mit ($p = 0,0001$) konnte zu allen Mess-Zeitpunkten mit dem *gepaarten T-Test* ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

4.5 Vergleich der enzymatischen Aktivitäten der Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3)

Die in Tabelle 19 dargestellte Übersicht zeigt im Vergleich die Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivitätswerte der jeweiligen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen, aufgeschlüsselt für die entsprechenden Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min. Für die Erstellung der Übersicht und die weiteren Auswertungen wurde am Ende aus allen enzymatischen Aktivitätswerten der einzelnen Schnittebenen aller Proben und Mess-Zeitpunkte je Untersuchungsgruppe ebenfalls der Mittelwert gebildet, der die relative enzymatische Aktivität für das gesamte Wurzel-Dentin einer Untersuchungsgruppe (UG 1 bis UG 3) angibt.

Tabelle 19: Übersicht der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne); dargestellt sind die errechneten Mittelwerte für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min

Mittelwert Untersuchungsgruppe Schnittebene Mess-Zeitpunkt	Mittelwert UG1 koronal	Mittelwert UG1 medial	Mittelwert UG1 apikal	Mittelwert UG2 koronal	Mittelwert UG2 medial	Mittelwert UG2 apikal	Mittelwert UG3 koronal	Mittelwert UG3 medial	Mittelwert UG3 apikal
Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min	9,88	10,65	12,35	9,43	10,75	11,64	8,71	10,38	13,79
Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min	9,28	10,00	11,60	8,86	10,10	10,94	8,18	9,75	12,96
Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min	8,85	9,53	11,06	8,45	9,63	10,43	7,80	9,30	12,35
Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min	8,23	8,86	10,28	7,86	8,97	9,70	7,27	8,66	11,51
MW - relative enzymatische Aktivität aller Schnittebenen je Untersuchungsgruppe	10,05			9,73			10,06		

Die Abbildung 21 verdeutlicht graphisch die Darstellung der enzymatischen Mittelwerte für das gesamte Wurzel-Dentin je Untersuchungsgruppe, jedoch auf die einzelnen Mess-Zeitpunkte bezogen.

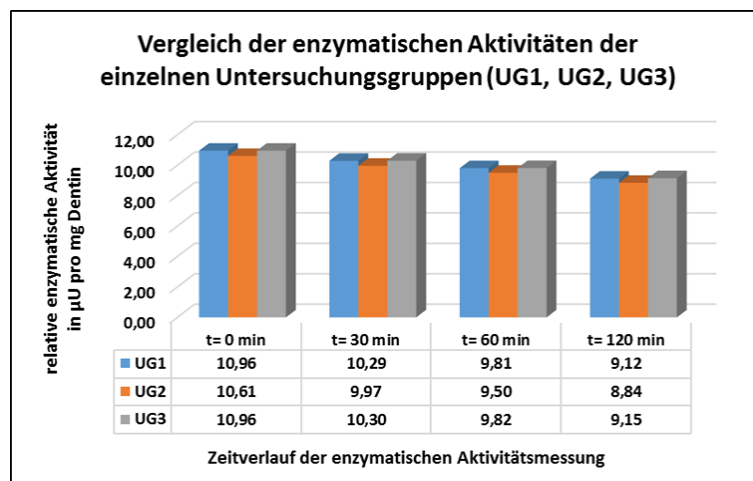


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Werte der relativen enzymatischen Aktivität (Mittelwerte aller Schnittebenen der Proben) in μU pro mg Dentin der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t=0$ min bis $t=120$ min

Zusammenfassend auf das Gesamt-Dentin (Tab. 19) bezogen, konnten letztendlich rechnerisch für die UG 1 (Gruppe der endodontisch behandelten Zähne) eine relative enzymatische Aktivität von $10,05 \mu\text{U}$ pro mg Dentin, für die UG 2 (Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne) eine enzymatische Aktivität von $9,73 \mu\text{U}$ pro mg Dentin und für die UG 3 (Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne) eine enzymatische Aktivität von $10,06 \mu\text{U}$ pro mg Dentin bestimmt werden. Analysiert man die Ergebnisse so kann festgestellt werden, dass sich die enzymatischen Aktivitäten zwischen der UG 1 und der UG 3 nicht wesentlich unterscheiden. Die rechnerisch geringste enzymatische Aktivität ist in

der UG 2 zu finden. Bezogen auf das gesamte Wurzel-Dentin lassen sich aber keine statistisch relevanten Unterschiede in der enzymatischen Aktivität erkennen.

Für die weiteren Auswertungen also den weiteren Vergleich der einzelnen Schnittebenen der jeweiligen Untersuchungsgruppen untereinander und den daraus resultierenden Graphiken (4.5.1. bis 4.5.3.) wurden jeweils von den relativen enzymatischen Aktivitätswerten der Dentin-Scheiben aller Proben der jeweiligen koronalen, medialen und apikalen Schnittebenen einer Untersuchungsgruppe für jeden Mess-Zeitpunkt die Mittelwerte gebildet.

4.5.1 Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der koronalen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)

Der Vergleich der dargestellten enzymatischen Aktivitätswerte aller koronalen Schnittebenen untereinander zeigt, dass in der koronalen Schnittebene der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne zu allen Mess-Zeitpunkten die höchsten enzymatischen Aktivitätswerte pro mg Dentin zu finden sind. Diese Aktivität nimmt über den zeitlichen Verlauf der Messung kontinuierlich ab. Ebenfalls zu allen Mess-Zeitpunkten finden sich die niedrigsten enzymatischen Aktivitätswerte in der koronalen Schnittebene der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne. Auch in dieser und in der koronalen Schnittebene der nicht endodontisch behandelten Zähne findet sich eine im Mess-Verlauf kontinuierlich, fast parallel zueinander, abfallende enzymatische Aktivität. Unterschiede zeigen sich nur im jeweiligen Niveau.

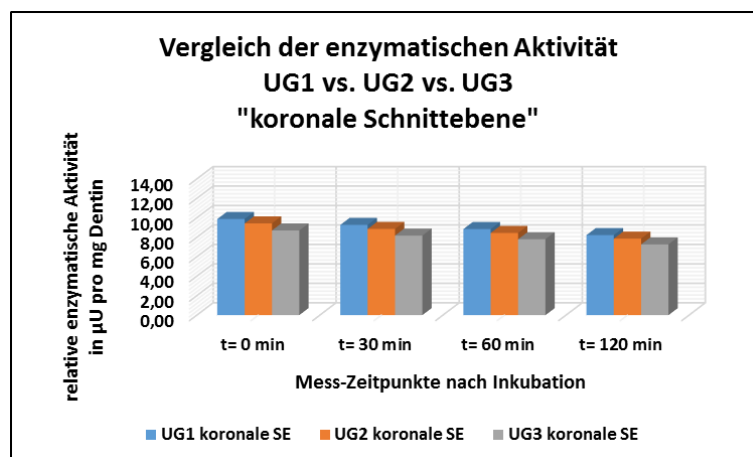


Abbildung 22: graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der jeweiligen koronalen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte t = 0 min bis t = 120 min

Die statistische Auswertung mit dem *ungepaarten T-Test* für Stichproben (UG 1 versus UG 2 mit $p = 0,5122$ bis $p = 0,5249$ sowie UG 1 versus UG 3 mit $p = 0,0809$ bis $p = 0,0907$ und UG 2 versus UG 3 mit $p = 0,2134$ bis $p = 0,2255$) konnte keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Werte der koronalen Schnittebenen der jeweiligen Untersuchungsgruppen herstellen.

4.5.2 Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der medialen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)

In der graphischen Darstellung der Abbildung 23 erkennt man die Unterschiede der relativen enzymatischen Aktivität in den medialen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten der EnzChek® Untersuchung. Dabei findet sich in allen medialen Schnittebenen der Untersuchungsgruppen eine im Mess-Verlauf kontinuierlich abnehmende enzymatische Aktivität, obwohl die Werte für die enzymatische Aktivität innerhalb der einzelnen Mess-Zeitpunkte jedoch auf annähernd gleichem Niveau zu liegen scheinen.

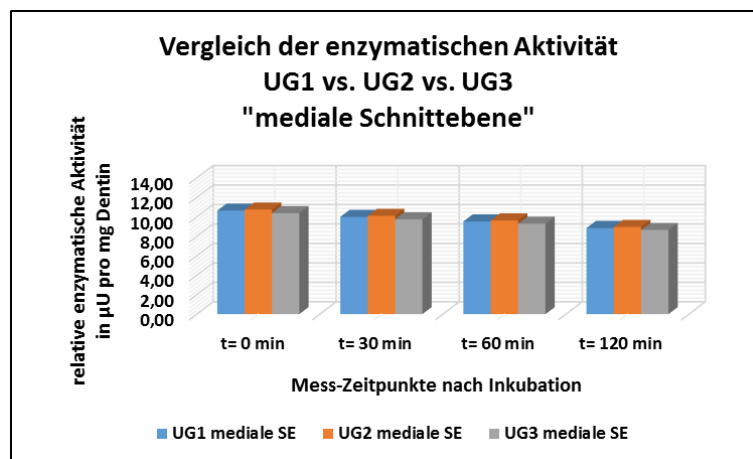


Abbildung 23: Graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in µU pro mg Dentin der jeweiligen medialen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte t = 0 min bis t = 120 min

Mit dem *ungepaarten T-Test* für Stichproben (UG 1 versus UG 2 mit $p = 0,8345$ bis $p = 0,8641$ sowie UG 1 versus UG 3 mit $p = 0,7201$ bis $p = 0,7515$ und UG 2 versus UG 3 mit $p = 0,5068$ bis $p = 0,5175$) konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen medialen Schnittebenen der jeweiligen Untersuchungsgruppen festgestellt werden.

4.5.3 Enzymatische Aktivitätswerte: Vergleich der apikalen Schnittebenen (UG 1, UG 2, UG 3)

Verglichen mit den anderen Auswertungen der jeweils gleichen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen zeigt sich hier bei den apikalen Schnittebenen wiederum ein etwas anderes Muster der enzymatischen Aktivitätsverteilung. In der apikalen Schnittebene der UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) findet sich die höchste enzymatische Aktivität und in der UG 2 (nicht endodontisch behandelten Zähne) findet sich die geringste enzymatische Aktivität. Auf den Mess-Verlauf gesehen findet sich in allen Schnittebenen der Untersuchungsgruppen eine kontinuierliche Abnahme der enzymatischen Aktivität (Abb. 24). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem *ungepaarten T-Test* durchgeführt.

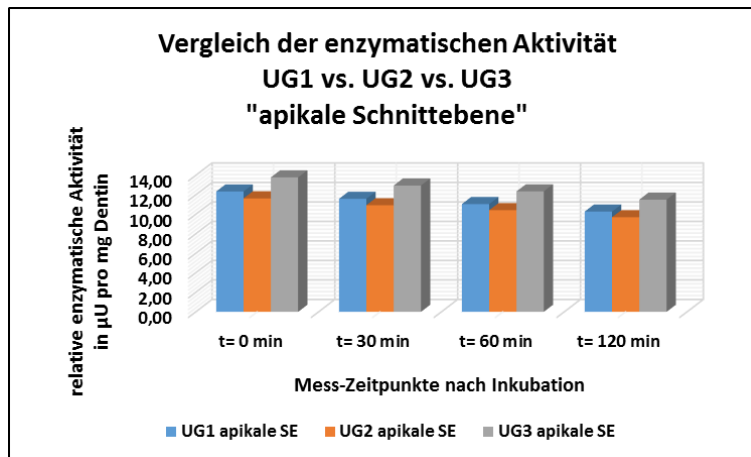


Abbildung 24: Graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der jeweiligen apikalen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min

Zwischen den apikalen Schnittebenen der Untersuchungsgruppen (UG 1 versus UG 2 mit $p = 0,5299$ bis $p = 0,5373$ und UG 1 versus UG 3 mit $p = 0,2490$ bis $p = 0,2568$) konnten keine signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden. Ganz im Gegensatz dazu steht der Vergleich der apikalen Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 und 3 (UG 2 versus UG 3 mit $p = 0,0144$ bis $p = 0,0137$), wo zwischen den enzymatischen Aktivitätswerten statistisch signifikante Zusammenhänge festgestellt wurden.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse (UG 1, UG 2 und UG 3)

Mit Hilfe des EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* wurde Dentin-Hartmaterial in Form von Dentin-Scheiben unterschiedlichster Untersuchungsgruppen auf eine unspezifische enzymatische Aktivität von MMP's getestet. In jeder der drei klassifizierten Untersuchungsgruppen, UG 1 (endodontisch behandelte Zähne), UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) und UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne), konnte eine unspezifische enzymatische Aktivität am Dentin-Hartmaterial nachgewiesen werden. Diese befand sich aber jeweils auf unterschiedlichsten Niveaus. Da die enzymatische Aktivität bzw. deren Änderung über einen zeitlichen Verlauf gemessen wurden, konnten Zeiten erhöhter, erniedrigter und abfallender enzymatischer Aktivität gemessen werden.

In der unter Gliederungspunkt (4.5) dargestellten Abbildung 21 sind die gemittelten relativen enzymatischen Aktivitäten der Proben der einzelnen Untersuchungsgruppen über den gesamten Mess-Zeitraum von $t = 0$ min bis $t = 120$ min dargestellt. Die enzymatischen Aktivitätswerte sind in μU pro mg Dentin angegeben. Anhand der Ergebnisse und den entsprechenden statistischen Auswertungen konnte für das gesamte Wurzel-Dentin nachgewiesen werden, dass die enzymatische Aktivität von MMP's zum Zeitpunkt $t = 0$ min, also sofort nach einer zweistündigen Inkubation der Proben bei 37°C , am Höchsten ist. Diese

fällt dann in allen Untersuchungsgruppen kontinuierlich und fast parallel bis zum Zeitpunkt $t = 120$ min ab. Augenscheinlich liegt dabei die Höhe der enzymatischen Aktivität auf dem gleichen Niveau. Betrachtet man allerdings die rein rechnerisch ermittelten Werte so findet sich die Höchste enzymatische Aktivität in der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne), gefolgt von der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne). Die geringste enzymatische Aktivität gesehen auf das gesamte Wurzel-Dentin findet sich in der Untersuchungsgruppe 2 (nicht wurzelbehandelte Zähne).

Für die statistisch verglichenen Werte zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen ergab der gerechnete *ungepaarte T-Test* zu allen Mess-Zeiten $t = 0$ min bis $t = 120$ min keine signifikanten Zusammenhänge. So betrugen die zwischen den Werten der endodontisch behandelten (UG 1) und nicht endodontisch behandelten Zähnen (UG 2) ermittelten Signifikanzwerte $p = 0,5084$ bis $p = 0,5290$, die zwischen den endodontisch behandelten (UG 1) und noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen (UG 3) $p = 0,9623$ bis $p = 0,9905$ und die zwischen den nicht endodontisch behandelten (UG 2) und noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen (UG 3) $p = 0,5144$ bis $p = 0,5319$.

Betrachtet man die Gewichtsmittelwerte der Dentin-Scheiben der einzelnen Gruppen so haben die Untersuchungsgruppen 1 und 2 mit 35,2 mg und die Untersuchungsgruppe 3 mit 34,4 mg fast identische Gewichtswerte. Da aber die enzymatische Aktivität in μU pro mg Dentin rechnerisch bestimmt wurde und die enzymatischen Aktivitäten der Einzelproben auf jeweils unterschiedlichen Niveaus lagen, scheint es keinen direkten Zusammenhang zwischen der Höhe des Gewicht und der enzymatischen Aktivität zu geben.

Zusammenfassend scheint es, dass die MMP-Aktivität vom gesamten Wurzel-Dentin aus gesehen zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen keine wesentlichen, zumindest statistisch nachweisbaren Unterschiede aufweist. Obwohl die geringen Unterschiede zwischen den Werten keine signifikanten Zusammenhänge erkennen lassen, scheint es aber dennoch anhand der jeweils errechneten Werte für die enzymatische Aktivität in den einzelnen Untersuchungsgruppen einen Trend zu geben. In dieser Untersuchung konnte für die Zähne die sich in der Mundhöhle befinden (UG 2) im Mittel eine enzymatische Aktivität von $9,73 \mu U$ pro mg Dentin, für die Zähne die endodontisch behandelt waren (UG 1) eine enzymatische Aktivität von $10,05 \mu U$ pro mg Dentin und für die Zähne die noch nicht in der Mundhöhle exponiert waren eine enzymatische Aktivität von $10,06 \mu U$ pro mg Dentin ermittelt werden. Dabei sind die ermittelten Werte sehr wahrscheinlich aber stark von den Einzelwerten der Proben abhängig, die in den Mess-Werten eine gewisse Volatilität aufwiesen.

4.7 Enzymatische Aktivität und Lagerungsmedien

Für die folgenden Lagerungsmedien: normales Wasser (H_2O), 70%iger Alkohol,

0,1%ige Thymollösung, 1%ige Thymollösung und Proben die über den Lagerungszeitraum bei -28°C tiefgefroren waren, wurde der Einfluss auf die enzymatische Aktivität im Wurzel-Dentin von humanem Zahnmaterial untersucht.

Die Testung der Dentin-Scheiben auf enzymatische Aktivität erfolgte nach dem bereits beschriebenen Procedere.

4.7.1 Gewicht der Proben (Testung Lagerungsmedien)

Der errechnete Mittelwert des Gewichts der Dentinscheiben die für beide Versuchsansätze zur Testung der Lagerungsmedien ermittelt wurde lag bei 28,9 mg.

Tabelle 20: Auflistung der Gewichtsangaben der Dentinscheiben und deren Mittelwerte der Versuche mit den unterschiedlichen Lagerungsmedien, Angaben in mg

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	MW - Gewicht aller Dentinscheiben
Probe 1	33	26	26	31	41	24	23	28	20	32	
Probe 2	40	32	27	32	30	33	16	31	26	25	
Probe 3	32	37	31	26	43	34	15	33	24	26	
Probe 4	36	41	26	28	33	26	18	43	21	24	
Probe 5	28	22	27	32	36	39	21	31	14	22	
MW - Gewicht je Lagerungsmedium	33,8	31,6	27,4	29,8	36,6	31,2	18,6	33,2	21,0	25,8	28,9

Die unterschiedlichen Gewichte der einzelnen Dentin-Scheiben innerhalb der unterschiedlichen Lagerungsmedien sind jeweils der anatomisch konischen Wurzelform geschuldet. Bei der Herstellung der Dentinscheiben wurde besonders auf eine einheitliche Dicke der Dentin-Scheiben geachtet.

4.7.2 Fluoreszenz und enzymatische Aktivitätswerte (Testung der unterschiedlichen Lagerungsmedien)

Auch für die Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Lagerungsmedien auf die Höhe der enzymatischen Aktivität wurden die im Punkt (4.1.2) ermittelten Standard-Kurven verwendet. Die Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte erfolgte, separat für alle Werte der einzelnen Mess-Zeitpunkte von $t = 0$ min bis $t = 120$ min. Dieses Vorgehen ist hier, wie bei den anderen Untersuchungsgruppen wieder für den Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min, dem Zeitpunkt nach erfolgter zweistündiger Inkubation exemplarisch dargestellt und beschrieben. In Tabelle 21 sind die gemessenen Fluoreszenzwerte der Aktivitätsmessung dargestellt.

Entsprechend der durch die Standard-Kurve ermittelten Berechnungsformel (4.1.2) $y = -0,597 x^2 + 218,93 x$ wurden die Fluoreszenz-Werte in die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten umgerechnet und letztendlich die relative enzymatische Aktivität in μU pro mg Dentin bestimmt. Diese Werte sind in Tabelle 22 dargestellt. Die berechneten enzymatischen Aktivitätswerte für die verbleibenden Mess-Zeitpunkte befinden sich zur Ansicht im Anhang.

Tabelle 21: Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Lagerungsmedien in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min generiert wurden

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)
Probe 1	2427	2163	1977	1871	2838	2222	2069	2663	2521	2057
Probe 2	3712	2794	2383	1888	3290	2728	2255	3053	2520	2285
Probe 3	4035	2522	2309	2102	2582	4018	1818	2578	2199	2351
Probe 4	6650	4312	2292	1893	2105	1807	2479	3117	1521	2350
Probe 5	3370	2406	2659	2173	2536	2060	2632	2452	1644	2071
MW - Fluoreszenz je Lagerungsmedium	4038,8	2839,4	2324,0	1985,4	2670,2	2567,0	2250,6	2772,6	2081,0	2222,8

Tabelle 22: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)
Probe 1	10,91	13,90	13,93	11,70	8,74	15,05	15,73	12,82	17,98	11,31
Probe 2	8,85	11,20	13,35	11,33	11,87	10,87	22,56	11,52	13,83	14,43
Probe 3	11,01	9,72	11,63	13,91	8,36	10,37	24,20	10,89	15,05	13,86
Probe 4	9,41	8,56	13,88	12,95	10,96	13,96	19,99	8,30	17,35	15,02
Probe 5	12,70	16,37	13,30	11,29	9,99	9,28	17,10	11,61	25,99	16,45
MW - enzymatische Aktivität je Lagerungsmedium	10,6	12,0	13,2	12,2	10,0	11,9	19,9	11,0	18,0	14,2

Die Analyse der graphischen Darstellung Abbildung 25 der Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivität pro mg Dentin für die gelagerten Dentin-Scheiben in den jeweils unterschiedlichen Lagerungsmedien zeigt ein eindeutiges Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität.

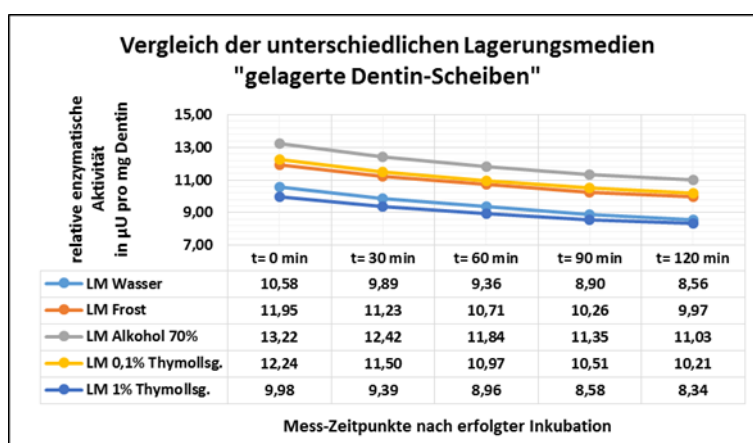


Abbildung 25: Lagerungsmedien (gelagerte Dentin-Scheiben) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation

Der Verlauf der enzymatischen Aktivität ist jeweils zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min nach erfolgter Inkubation am Höchsten. Bis zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min sinkt die enzymatische Aktivität kontinuierlich in allen Lagerungsmedien ab. Dabei fällt wie bei allen anderen enzymatischen

Messungen auf, dass sie in allen Proben fast parallel zueinander fällt. Die einzelnen Proben weisen unterschiedliche Werte auf.

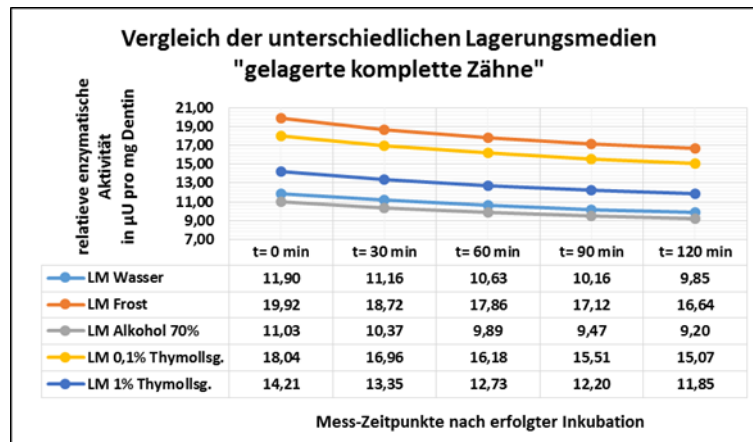


Abbildung 26: Lagerungsmedien (gelagerte komplette Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation

Die graphische Darstellung Abbildung 26 der Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivität pro mg Dentin für die gelagerten kompletten Zähne in den jeweils unterschiedlichen Lagerungsmedien zeigt das gleiche eindeutige Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität, wie das der gelagerten Dentin-Scheiben. Unterschiedlich sind nur die einzelnen Niveaus der enzymatischen Aktivität.

4.7.3 Vergleich der Lagerungsmedien bei gelagerten Dentin-Scheiben: Versuchsansatz 1

Die folgende Abbildung 27 stellt die aus den Mess-Werten errechneten durchschnittlichen relativen Aktivitätswerte der in den entsprechenden Lagerungsmedien gelagerten Dentin-Scheiben (*Versuchsansatz 1*) dar.

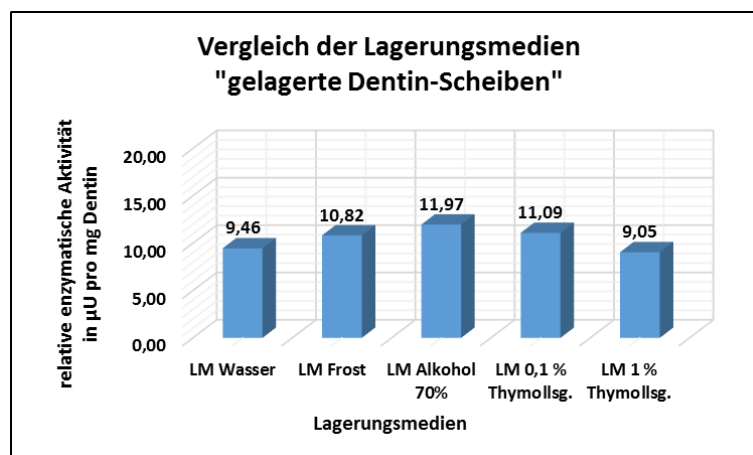


Abbildung 27: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte (aller Mess-Zeiten) der relativen enzymatischen Aktivität in $\mu\text{U pro mg Dentin}$ der gelagerten Dentin-Scheiben in den entsprechenden Lagerungsmedien

Man erkennt deutliche Unterschiede in der Höhe der relativen enzymatischen Aktivität der

Proben, die in den entsprechenden Lagerungsmedien über einen Zeitraum von 65 Tagen gelagert wurden. Die höchsten enzymatischen Aktivitätswerte mit $11,97 \mu U$ pro mg Dentin finden sich für die Proben, die in 70%igem Alkohol gelagert wurden. Für das Lagerungsmedium Frost mit $10,82 \mu U$ pro mg Dentin und 0,1%ige Thymollösung mit $11,09 \mu U$ pro mg Dentin liegen die Werte etwa auf einem gleichen Niveau. Die niedrigsten enzymatischen Aktivitäten finden sich mit Werten von $9,46 \mu U$ pro mg Dentin für das Lagerungsmedium Wasser und mit $9,05 \mu U$ pro mg Dentin in den Proben für das Lagerungsmedium 1%ige Thymollösung.

Da bei den Untersuchungen zu den Lagerungsmedien Einzelwerte generiert wurden, bei denen zusätzlich die Verteilung der Proben der koronalen, medialen und apikalen Schnittebenen zufällig erfolgte, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

4.7.4 Vergleich der Lagerungsmedien bei gelagerten kompletten Zähnen: Versuchsansatz 2

In der nachfolgenden Abbildung 28 sind die aus den Mess-Werten errechneten durchschnittlichen relativen Aktivitätswerte der in den entsprechenden Lagerungsmedien gelagerten kompletten Zähne (*Versuchsansatz 2*) dargestellt.

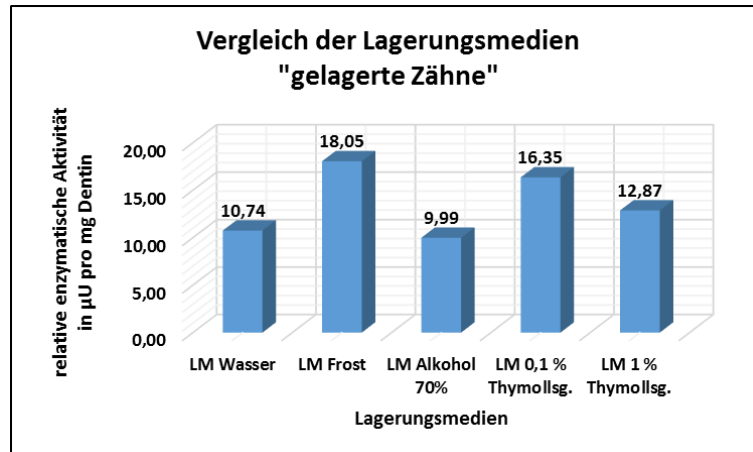


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte (aller Mess-Zeiten) der relativen enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der gelagerten kompletten Zähne in den entsprechenden Lagerungsmedien

Wie in der Darstellung der enzymatischen Aktivitätswerte des Versuchsansatzes 1 finden sich auch hier Unterschiede in der jeweiligen Höhe der enzymatischen Aktivität, bezogen auf die jeweiligen Lagerungsmedien. So finden sich hier in den Proben aus den komplett gelagerten Zähnen mit $18,05 \mu U$ pro mg Dentin die höchsten enzymatischen Aktivitätswerte im Lagerungsmedium Frost. Für die Proben des Lagerungsmediums 0,1%ige Thymollösung wurde im Mittel eine enzymatische Aktivität von $16,35 \mu U$ pro mg Dentin und für das Lagerungsmedium 1%ige Thymollösung ein Wert von $12,87 \mu U$ pro mg Dentin ermittelt. Die

niedrigsten enzymatischen Aktivitätswerte wurden für die Proben des Lagerungsmediums 70%iger Alkohol mit $9,99 \mu U$ pro mg Dentin und für das Lagerungsmedium Wasser mit $10,74 \mu U$ pro mg Dentin festgestellt.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Lagerungsmedien

Die standardmäßige Lagerung von humanen oder bovinen Zähnen oder Zahnbestandteilen erfolgt an der Universität des Saarlandes prinzipiell in 0,1%iger Thymollösung. Der Vergleich der Lagerungsmedien in Bezug auf eine eventuelle Beeinflussung dieser auf die enzymatische Aktivität ergab keine Ergebnisse, die einer Verwendung von 0,1%iger Thymollösung widersprechen würden.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Dentinscheiben mit Hilfe des EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* auf das Vorhandensein einer unspezifischen enzymatischen Aktivität getestet. Der Literaturstudie zufolge sind momentan nur Studien (*Pashley et al., 2004; Nishitani et al., 2006*) beschrieben, die sich mit der kollagenolytischen und gelatinolytischen Aktivitätstestung am pulverisierten Dentin beschäftigen. Dementsprechend sind keine Studien bekannt, die sich mit einer Testung enzymatischer Aktivität am Dentin-Hartmaterial näher auseinandersetzen. Um aber einen passablen Weg zu finden, Dentin-Hartmaterial ebenfalls auf eine unspezifische enzymatische Aktivität, hervorgerufen durch im Dentin lokalisierte MMP's, zu testen, wurde diese Studie durchgeführt. Konkretisiert stellte sich als erstes die Fragestellung eines Unterschiedes einer nachweisbaren enzymatischen Aktivität zwischen endodontisch behandeltem Wurzel-Dentin (UG 1), nicht endodontisch behandeltem Wurzel-Dentin (UG 2) und Wurzel-Dentin von noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen (UG 3). In einem parallel dazu verlaufenden Untersuchungsschritt sollte der Einfluss eines Lagerungsmediums auf die zu messende enzymatische Aktivität untersucht werden.

5.1 Diskussion Material und Methoden

Für die Durchführung der Testreihen wurde ein kommerziell vertriebenes EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* der Firma *Molecular Probes® (Eugene, OR, USA)* als Kombinationspack verwendet. Die Anwendung dieses Testes ist mehrfach in der Literatur (*Hebling et al., 2005; Nishitani et al., 2006*) beschrieben worden und in der Durchführung unsererseits nicht verändert worden.

5.1.1 Auswahl und Herkunft der Dentinproben

Für die durchgeführten Testreihen wurden ausschließlich humane Zähne unterschiedlicher Herkunft verwendet. Grundbedingung, um in die Studie aufgenommen zu werden, war kariesfreies Wurzel-Dentin. Die Versorgung der Zähne im Kronenbereich hatte keine Bedeutung. Ein Einfluss der Versorgungssituation des Zahnes auf die Beschaffenheit des Wurzel-Dentins ist bisher nicht bekannt. Keine Aussage über das verwendete Wurzel-Dentin kann jedoch in Bezug auf die Exposition zur Mundhöhle, wie z.B. bei parodontalem Knochenabbau oder sonstigen Defekten am Zahnhalteapparat gegeben werden. Somit kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass eventuell durch die natürlichen Schwankungen im pH-Bereich der Mundhöhle, durch bakterielle Säuren, MMP's aktiviert wurden (*Tjäderhane et al., 1998; Chaussain-Miller et al., 2006*). Diese könnten unter anderem, durch nicht visuell sichtbare Läsionen oder sonstige Veränderungen, mit einem Einfluss auf die Konsistenz und

Beschaffenheit des Wurzel-Dentins einhergegangen sein. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann eine Beeinflussung der Messergebnisse lediglich für die Proben der Untersuchungsgruppe 3 ausgeschlossen werden, da diese noch keine Exposition in der Mundhöhle hatten. Da die Minimal- und Maximalwerte sowie die Standardabweichungen der Enzymaktivitäten für alle Gruppen im vergleichbaren Rahmen lagen, spielten Kronenversorgung und parodontaler Zustand in dieser Untersuchung wahrscheinlich keine Rolle.

5.1.2 Lagerung der Zähne und Proben – Substanzen

Da die ausgesuchten Zähne und die letztendlich daraus gewonnenen Dentin-Scheiben für eine enzymatische Flächentestung am Wurzel-Dentin im Rahmen einer *In-vitro* Studie verwendet werden sollten, kommt der Lagerung der Proben eine wesentliche Bedeutung zu. Prinzipiell sollten die Untersuchungsproben in einem wässrigen Milieu gelagert werden, um eine Austrocknung des Dentins zu vermeiden und um das feuchte Milieu der Mundhöhle zu simulieren.

In der Literatur werden die verschiedensten Lagerungsmedien wie z.B. destilliertes Wasser, Formalin-Lösungen in unterschiedlichsten Konzentrationen, physiologische Kochsalzlösung, 0,1%ige Thymollösung und Wasserstoffperoxid in Zusammenhang mit der dentinadhäsiven Haftkraft und der Dentinpermeabilität beschrieben (*Ziskind et al., 2003*).

Hierbei ist zu bedenken, dass sich das entsprechende Lagerungsmedium durch den Kontakt mit dem zu untersuchenden Gewebe nachteilig auf die zu untersuchende Variable oder das Gewebe selbst auswirken könnte (*Ziskind et al., 2003*). Daraus schlussfolgernd und um zusätzlich eine bakterielle Kontamination der einzelnen Dentin-Scheiben oder sonstiger infektiöser Materialien zu vermeiden, wurden die Zähne und die Dentin-Scheiben in 0,1%iger Thymollösung im Kühlschrank gelagert.

Für die Lagerung der Proben der Untersuchungsgruppen 1 bis 3 wurde die Standardlagerung von Zähnen und Zahnbestandteilen der Universität des Saarlandes in 0,1%iger Thymollösung angewendet. Der eventuelle Einfluss eines Lagerungsmediums auf die zu untersuchende Variable (enzymatische Aktivität) wird noch einmal speziell unter Punkt (5.2.1) diskutiert.

5.1.3 Dentin-Hartmaterial versus Dentinpool

Die von *Pashley et al., (2004)* beschriebene und unter anderen von *Hebling et al., (2005)*, *Nishitani et al., (2006)* angewendete Pulverisierung des Dentins für eine enzymatische Aktivitätsmessung mit dem EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit* vermischt das Dentin verschiedener Dentinproben. Da das Dentin bei dieser Methode mit einer

Schwingmühle partikularisiert wird, ist eine mechanische Veränderung der Kollagenstruktur und somit auch der Komplexität der MMP's nicht eindeutig auszuschließen.

Demgegenüber ermöglicht die Verwendung von Dentin-Hartmaterial (Dentin-Scheiben) die enzymatische Aktivitätstestung der MMP's an einer definierten Gesamtoberfläche. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise ist die Möglichkeit der Testung von Einzelproben (einzelne Zähne) mit definierten und bekannten Einflussgrößen. Außerdem konnten durch das Design der Studie, indem jeweils aus der Zahnwurzel einer jeweiligen Probe eine koronale, mediale und apikale Wurzel-Dentin-Scheibe gefertigt wurde, Aussagen über die enzymatische Aktivitätsverteilung innerhalb der Zahnwurzel generiert werden. Somit erhielt man gezielte Ergebnisse auf den Einzelzahn bezogen, was für eine hohe Sensivität des Versuchsaufbaues spricht.

Einer eventuellen Veränderung der Kollagenmatrix und der Beschaffenheit der Struktur der MMP's durch die Schwingmühle bei der Partikularisierung des Dentins, sollte man eine mögliche Veränderung der gleichen Strukturen beim Sägen und Polieren der einzelnen Dentinscheiben gegenüberstellen.

Ein weiterer Punkt der eventuellen Beeinflussung der Testergebnisse ist die Lage der Dentin-Scheiben im Untersuchungswell für die Fluoreszenzmessung, da an der Unterseite der Dentin-Scheiben keine messbare Umsetzung von fluoreszenzmarkiertem Substrat erfolgen kann. Die Unterseite der Dentinscheibe wurde zwar mit EDTA-Lösung auf dem Schüttler demineralisiert, aber während der Inkubation und der eigentlichen Fluoreszenzmessung der Proben wurden diese nicht mehr bewegt.

Die Problematik hinter diesem Aspekt besteht darin, dass der zu messende Versuchsansatz aus einer inhomogenen und nicht wie bei der normalen Fluoreszenzmessung aus einer homogenen Flüssigkeit besteht. Ähnliches wird allerdings auch von *Alai-Omid, (2008)* für die Verwendung von Dentinpulver beschrieben.

Für beide Methoden gilt allerdings, dass es sich hier um *In-vitro* Verfahren handelt, die mit ihren Ergebnissen nicht vollständig auf den klinischen Aspekt übertragen werden können.

5.1.4 Enzymatische Aktivitätsmessung - EnzChek®

EnzChek® (Methodenvergleich)

Mit dem EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit* steht ein kommerzieller Enzymtest für eine unspezifische Enzymaktivitätstestung für klinische und labortechnische Untersuchungen zur Verfügung. Durch die spezifische Substratspaltung, so wie es der normalen Aufgabe der zu untersuchenden Enzyme auch *In-vivo* entspricht, können über ein relativ einfaches Verfahren die Aktivität und daraus dann die Konzentration der Enzyme bestimmt werden. Der Grundsatz dieses Verfahrens liegt in der Fluoreszenzmarkierung der Substrate, deren

Spaltprodukte durch die enzymatische Spaltung eine Fluoreszenz auf einem anderen Niveau erreichen. Diese Fluoreszenzunterschiede sind mit einem Fluoreszenzmessgerät leicht zu messen. In der Literatur wird diese Methode der Testung auf eine enzymatische Aktivität beschrieben und angewendet (*Pashley et al., 2004, Hebling et al., 2005, Nishitani et al., 2006, Tay et al., 2006*). Da bei den Untersuchungen dieser Studie Dentin-Scheiben verwendet wurden, stellt der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung, im Gegensatz zu der ebenfalls in der Literatur publizierten und angewendeten Western-Blot-Methode (Immunblot) (*Tjäderhane et al., 1998, Sulkala et al., 2002, Martin-De Las Heras et al., 2006, De Paula-Silva et al., 2009, Dezerega et al., 2012*) und der Zymographie (*van Strijp et al., 2003, Hernández Ríos et al., 2009*), ein wenig zeit- und kostenintensives Verfahren dar. Western Blot bedeutet, das Übertragen (engl. Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran, wobei die Proteine dann anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können. Neuerdings kommen dabei zur Markierung vor allem monoklonale Antikörper zum Einsatz, wobei dann durch eine Antigen-Antikörper Reaktion die entsprechenden Proteine (auch MMP's) identifiziert werden können. Bei der Durchführung zymographischer Methoden wird dagegen wiederum die substratspezifische Aktivität von Enzymen genutzt, um diese darstellen bzw. quantifizieren zu können. Zymographie basiert auf Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei werden die durch das Gel wandernden MMP's, die aufgrund ihrer Verbindung mit SDS negativ geladen sind, im anliegenden elektrischen Feld transportiert. Durch ihre unterschiedlichen Molekulargewichte haben die einzelnen MMP's und ihre inaktiven Vorstufen eine unterschiedliche Wanderung im elektrischen Feld.

Western Blot und Zymographie sind somit hochspezifische und aufwendige Verfahren zum Nachweis von spezifischen Proteinen. In dieser Spezifität zeigt sich der Nachteil der EnzChek®-Methode, welche lediglich auf eine unspezifische enzymatische Aktivität testen kann. Zum weiteren können durch diese Methode lediglich aktivierte MMP's nachgewiesen werden. Die Pro-MMP's können dagegen nicht klassifiziert und nachgewiesen werden. Demgegenüber können aber aufgrund einer Korrelation zwischen Gewicht und enzymatischer Aktivität die Aktivitätswerte (Konzentration) pro Gewichtseinheit Dentin ermittelt werden. Ebenfalls können durch die EnzChek®-Methode bei entsprechender Versuchsplanung Ergebnisse über die Verteilung der MMP's innerhalb einer Probe generiert werden, da eine Partikularisierung des Dentins nicht unbedingt als nötig erscheint.

5.1.4.1 Substrat

Für das EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit* besteht die Möglichkeit verschiedene fluoreszenzmarkierte Substrate zu verwenden. So stehen unter anderem DQ®-Gelatine und DQ®-Collagen zur Verfügung. Entsprechend der Einteilung der MMP's durch (*Lynch und Matrisian, 2002*) gelten sowohl Gelatin, als auch Collagen, als mögliche Stoffwechselsubstrate

für verschiedene MMP's wie z.B. MMP-1, MMP-3, MMP-8, sowie MMP-2 und MMP-9. Die Lokalisation der MMP's nach abgeschlossener Zahnentwicklung ist noch nicht vollständig geklärt (*Boushell et al., 2008*). Vermutungen gehen jedoch dahin, dass sich einige inaktive Vorstufen im Dentin befinden (*Martin-De Las Heras et al., 2000*). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass MMP-3 vorwiegend auf bzw. um die intertubulären Kollagenfasern des Dentins lokalisiert ist und das MMP-2 offensichtlich im Prädentin an der Schmelz-Dentin-Grenze (DEJ) in Verbindung mit den Odontoblastenfortsätzen und der Kollagenmatrix konzentriert ist (*Boushell et al., 2008*).

In seinen Untersuchungen konnte *Alai-Omid, (2008)* jedoch nachgewiesen, dass sowohl fluoreszenzmarkierte Gelatine als auch fluoreszenzmarkiertes Collagen von den MMP's im partikularisiertem Dentin umgesetzt wurden und dabei keinerlei Unterschiede in der Enzymaktivität der MMP's im Dentin zu verzeichnen waren.

Aus der Überlegung her, dass der Enzymtest (EnzChek®) auf eine unspezifische enzymatische Aktivität testet und aus der Substratspezifität der MMP's folgernd, wurde in den Untersuchungen dieser Studie *DQ®-Gelatine* als Substrat verwendet. Für alle Testreihen wurden insgesamt zwei EnzChek®-Packungen (*LOT 1543434 und LOT 1644683*) verwendet. Damit mussten für die Durchführung der Testreihen auch zwei verschiedene *DQ®-Gelatine-Lösungen* als Substrat verwendet werden, weil pro EnzChek®-Packung jeweils nur eine pulverisierte Lösung zur Verfügung stand. Da es sich bei den gemessenen enzymatischen Aktivitäten um sehr geringe, im $\mu\text{U-Bereich}$ liegende Werte handelt, sollte in Erwägung gezogen werden, dass zwei unterschiedliche *DQ®-Gelatine-Lösungen* aber möglicherweise in Hinsicht auf unterschiedliche Konzentrations- bzw. Reaktionsmerkmale, bei der Herstellung und beim Anmischen des pulverisierten Grundsubstrates, zu einer Fehlerquelle geführt haben könnten. Das Substrat ist in dieser Hinsicht für eine der wichtigsten Reaktionen des eigentlichen Enzymtestes verantwortlich. Die industrielle Herstellung der Testpackungen mit einem entsprechenden Qualitätsstandard sollte aber diese eventuelle Fehlerquelle minimiert haben.

5.1.4.2 Entmineralisierung

Da an den Dentin-Scheiben eine Oberflächentestung der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden sollte, wurden diese zur Schaffung einer einheitlichen Oberflächenstruktur von beiden Seiten poliert. Alle Dentin-Scheiben wurden mit einem wasserfesten Schleifpapier der Körnung *P 2500* unter ständiger Wasserkühlung poliert. Somit kann von einem gleichen Oberflächenrelief an den Polierflächen ausgegangen werden. Solange die Dentin-Matrix-Struktur aber mineralisiert ist, bleiben die in ihr enthaltenen MMP's inaktiviert (*Nishitani et al., 2006*). Es wird vermutet, dass die MMP's, insbesondere die Gelatinasen, in die organische Matrix des Dentins eingebaut sind und durch die Mineralisierung des Dentins

geschützt werden (*Sulkala et al., 2007*). Wie in der Literatur beschrieben, können durch eine geringe Entmineralisierung des Dentins z.B. durch Säureätzung mit zweistufigen Dentinadhäsiven und auch durch selbstätzende Adhäsive im Dentin liegende MMP's, wie MMP-2 und MMP-9 aktiviert werden (*Mazzoni et al., 2013*). In der klinischen Anwendung der Füllungstherapie demineralisiert man heutzutage das Dentin 15 Sekunden mit 30 bis 37%iger Phosphorsäure. Längere Einwirkzeiten der Säure bedeuten eine tiefere Entmineralisierung, was füllungstechnisch eine tiefere Harzimpregnierung und somit auch eine dickere Hybridschicht zur Folge hätte, was aber den Haftverbund nicht unbedingt verbessern würde (*Van Meerbeek et al., 2003, Hellwig et al., 2006*). Daraus kann man schlussfolgern, dass durch Säureätzung das Kollagennetzwerk des Dentins freigelegt wird (*Van Meerbeek et al., 2003, Hellwig et al., 2006*).

Um aber bei den enzymatischen Enzymtestungen eine möglichst tiefe Demineralisierung zu erreichen, um eine möglichst große Anzahl von Kollagenfibrillen und mögliche in ihrer Matrix eingeschlossene MMP's freizulegen, wurden die einzelnen Dentin-Scheiben mit 0,5 M EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure) über einen Zeitraum von 10 min behandelt. Natriumedetat ist ein Chelatbildner, welcher mit den Kalziumionen des Dentins einen stabilen Chelatkomplex bildet und dabei zur säurefreien Auflösung der Dentinstruktur beiträgt. Das Dentin wird somit entmineralisiert und erweicht. In Betracht gezogen werden sollte auch die Tatsache, dass durch die Entmineralisierung freiliegende Kollagenfasern als nicht fluoreszenzmarkiertes zusätzliches Substrat entstehen könnten. Dieses würde dann durch die freigesetzten und aktivierten MMP's zusätzlich abgebaut werden. Diese nicht nachweisbare Reaktion führt dann wahrscheinlich allerdings zu einer Beeinflussung der gemessenen Fluoreszenz und damit zur errechneten enzymatischen Aktivität der Proben. Es könnte somit eine schleichende enzymatische Aktivität vorliegen, die durch die Versuchsanordnung der Fluoreszenzänderung nicht erfasst werden kann.

5.1.4.3 Eigenfluoreszenz

Eine Problematik innerhalb des Testes ist bei den fluoreszenzmarkierten Substraten zu sehen, da diese selbst über eine Grund- oder Eigenfluoreszenz verfügen. Eine mechanische oder sonstige Beschädigung bzw. Zerstörung der Substrate innerhalb des Testverfahrens, würde letztendlich zu einer verfälschten Änderung der Fluoreszenzwerte führen. Damit wäre die Umrechnung der Fluoreszenzwerte in die enzymatische Aktivität und danach in entsprechende Konzentrationswerte sehr fehlerbehaftet. Dieses Problem wurde in den Untersuchungsreihen dieser Studie durch das Mitführen von Standardlösungen definierter Konzentrationen und einer sogenannten *Null- oder Blank-Probe* gelöst. Die *Null-Probe* enthielt alle Reaktionslösungen und das entsprechende Substrat, jedoch keine Enzyme, die zu einer Umsetzung des Substrates hätten führen können. Die Fluoreszenzänderungen während des

zeitlichen Verlaufes der Messungen sind demzufolge nur aufgrund der Eigenfluoreszenz des Substrates entstanden. Nimmt man an, dass quasi in den andern Untersuchungsanordnungen (*Well*) eine gleiche Eigenfluoreszenz des Substrates auftritt, so kann rechnerisch durch einfache Differenzbildung zwischen dem gemessenen Fluoreszenzwert pro Untersuchungs*well* und dem Fluoreszenzwert der Nullprobe das Problem der Eigenfluoreszenz des Substrates ausgeglichen werden. Für die Umrechnungen der Fluoreszenzwerte in die entsprechende enzymatischen Aktivitäten und Konzentrationswerte wird somit der Fehler minimiert.

5.1.4.4 Substanzen und Reaktions-Lösungen

Bereits *Alai-Omid*, (2008) untersuchte die notwendige Dentinmenge für eine EnzChek®-Testung auf gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität. Er untersuchte die Verwendung von verschiedenen Dentinpulvermengen (*0 mg bis 80 mg*) in Bezug auf eine zu messende enzymatische Aktivität. Als Ergebnis seiner Untersuchungen stand die Feststellung, dass eine Erhöhung der Dentinpulvermenge eine erhöhte Fluoreszenz zu Folge hatte. Er legte die notwendige Dentinpulvermenge auf *50 mg* fest. In der Literatur finden sich jedoch wenige Angaben zur Verwendung der notwendigen Dentinmenge. Lediglich noch (*Nishitani et al.*, 2006, *Tay et al.*, 2006) schlagen in ihren Studien die Verwendung von *80 mg* Dentinpulver vor. Die in der Literatur vorhandenen wissenschaftlichen Arbeiten (*Pashley et al.*, 2004, *Nishitani et al.*, 2006) beschreiben zwar die Verwendung der EnzChek®-Methode, aber nicht die Mengen der verwendeten Reaktions-Lösungen für den Testes selbst. In der Studie von *Tay et al.*, (2006) finden sich jedoch Hinweise darauf. So werden die Verwendung von *180 µl* Reaktionspuffer und *20 µl* fluoreszenzmarkiertem Substrat, die dann je Untersuchungs*well* pipettiert werden, vorgeschlagen. In der wissenschaftlichen Arbeit von *Alai-Omid*, (2008) ist zwar aufgeführt, dass für die Versuchsanordnung je *Well* *10 µl* fluoreszenzmarkiertes Substrat verwendet wurden, jedoch werden keine Aussagen über die Menge an Reaktionspuffer getroffen.

Verarbeitet man Dentin-Hartmaterial zu Dentinpulver so kommt es durch die Partikularisierung zu einer Vergrößerung der Oberfläche, an der auf MMP-Aktivität getestet werden kann. Die für die vorliegende Untersuchung angefertigten Dentin-Scheiben für die Untersuchungsgruppe 1 und 2 hatten im Mittel ein Gewicht von *35,2 mg* je Probe und für die Untersuchungsgruppe 3 von *34,4 mg*. Da das Studiendesign vorsah, enzymatische Aktivität am Dentin-Hartmaterial zu testen, musste darauf geachtet werden, dass das komplette Untersuchungsmaterial von Reaktionsflüssigkeiten umgeben war. Im Gegensatz zu den Literaturangaben, über die verwendeten Dentinmengen und die verwendeten Reaktionslösungen wurden für die Enzymtestungen der Untersuchungsgruppe 1, 2 und 3 jeweils *80 µl* Reaktionspuffer und *20 µl* fluoreszenzmarkiertes Substrat aus dem Testkit verwendet. Damit wurden auch die in der

Testanweisung empfohlenen Lösungsmengen für die Fluoreszenzmessung verwendet. In Vorversuchen mussten aufgrund der Größe der angefertigten Dentin-Scheiben für die Untersuchungsgruppe 3, für die Messung je Well, jeweils die doppelten Mengen an Reaktionspuffer (160 μ l) und fluoreszenzmarkiertem Substrat (40 μ l) pipettiert werden. In diesem Fall wurden auch die Reaktions-Lösungen für die Berechnung der Standard-Kurven verdoppelt, sodass letztendlich das Verhältnis der Fluoreszenzänderungen im Vergleich zu den anderen Untersuchungsgruppen angeblich gleich geblieben wäre. Da die einzelnen Dentin-Scheiben entsprechend der Wurzel der Untersuchungszähne geformt waren, mussten sie aber teilweise gebrochen werden, um plan bzw. eben im Untersuchungswell liegen zu können. Trotzdem konnten dabei aber nicht alle freiliegenden Dentinflächen der einzelnen Bruchstücke mit Reaktionslösungen bedeckt werden. Da jedoch nicht alle Dentin-Scheiben, auch innerhalb einer Untersuchungsprobe von koronal nach apikal gebrochen werden mussten, entstand eine gewisse Fehlerquelle in Bezug auf die Oberflächentestung an den jeweiligen Bruchkanten. Diese Fehlerquelle war zunächst nicht akzeptabel und konnte nur dadurch minimiert und ausgeglichen werden, indem für die Untersuchungsgruppe 3 Zahnmaterial gesammelt wurde, dass in Form und Größe dem der anderen Untersuchungsgruppen entsprach. Besonders wurde dabei auf das durchschnittliche Lumen des Wurzelkanals geachtet. Dies galt besonders auch für das Zahnmaterial der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien. Letztendlich konnten für alle Versuchsreihen die gleichen oben beschriebenen Substanz- und Reaktionslösungsmengen verwendet werden und eine Bedeckung der Dentin-Scheiben im Untersuchungswell war damit gewährleistet. Somit konnten für alle enzymatischen Testungen die gleichen Bedingungen geschaffen werden.

5.1.4.5 Inkubation und Mess-Zeitpunkte

Während der durchgeführten Fluoreszenzmessungen an den Proben der einzelnen Untersuchungsgruppen sind in Bezug auf die enzymatische Aktivität gruppenspezifische Verteilungsmuster der Fluoreszenzänderung während des zeitlichen Messverlaufes aufgefallen. Die Fluoreszenzänderungen, gekennzeichnet durch die Umsetzung von fluoreszenzmarkiertem Substrat, zeigten nach der Inkubation zu den jeweiligen Mess-Zeitpunkten deutliche Veränderungen in ihrer Intensität. Während diese Intensität zum ersten Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min nach Inkubation jeweils in allen untersuchten Proben am Höchsten war, fiel sie bis zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min kontinuierlich stark ab. Bei diesem gleichbleibend kontinuierlichen Abfall der enzymatischen Aktivität in allen Proben, lag diese jedoch immer im Vergleich der einzelnen Proben zueinander, auf einem unterschiedlichen Höhenniveau. Nach Pipettierung der Untersuchungslösungen für die Fluoreszenzmessung stellte sich als erstes die Frage nach dem geeigneten Messbeginn. In der Literatur wird diese

Frage unterschiedlich diskutiert. Untersuchungen von *Pashley et al.*, (2004) gehen davon aus, den Probenansatz bei einer sehr geringen enzymatischen Aktivitätserwartung, 24 h zu inkubieren, während dessen *Yokato et al.*, (2003) eine Inkubationszeit von 2 h vorschlägt. In der Studie von *Tay et al.*, (2006) werden sogar 72 h Inkubationszeit vorgeschlagen. Für den Test selbst wird in der Testbeschreibung bei einer Konzentration von 10^{-3} U/ml der Enzyme für die Standard-Lösungen eine Inkubationszeit von ebenfalls 2 h vorgeschlagen. Auffällig ist die unterschiedliche Angabe der Temperatur während der Inkubationsphase. Während in der Testbeschreibung der Herstellerfirma eine Inkubationstemperatur von 37°C empfohlen wird, wurde bei *Pashley et al.*, (2004) der Probenansatz bei 25 °C und bei *Yokato et al.*, (2003) der Probenansatz bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Untersuchungen von (*Nishitani et al.*, 2006) wurde der Probenansatz über 24 h und bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Auch bei den Studien von *Tay et al.*, (2006) wurde bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. In seinen Untersuchungen konnte (*Alai-Omid*, 2008) allerdings nachweisen, dass eine gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität schon nach 2 h Inkubationszeit messbar ist. Da es in dieser Untersuchung darum ging, am Dentin-Hartmaterial eine enzymatische Aktivität nachzuweisen, wurde entsprechend der Vorgaben von *Yokato et al.*, (2003) und *Alai-Omid*, (2008) der Probenansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Literatur konnten allerdings keine Hinweise über eventuelle Mess-Zeiten entnommen werden. Da es im Vorfeld nicht abschätzbar war, wie hoch die zu erwartende enzymatische Aktivität sein würde, wurden für die Untersuchung Mess-Zeiten von $t = 120$ min bis $t = 240$ min, gerechnet vom Ansatz der Reaktionsproben her bei einer Temperatur von 37°C festgelegt. Vorversuche hatten zudem ergeben, dass nach einer Mess-Zeit von $t = 240$ min ein extrem starker Abfall der enzymatischen Aktivität von stattem geht, der sich dann letztendlich auf einem stabilen Niveau einpendelt. Um eventuelle Schwankungen der enzymatischen Aktivität erfassen zu können wurde in den Vorversuchen der Messzeitraum auf 24 h festgelegt. Für die Hauptversuche wurde dann jedoch ein Mess-Zeitraum bis $t = 120$ min nach Inkubation festgelegt.

5.2 Diskussion der einzelnen Ergebnisse - Vergleich mit der Literatur

Matrix-Metalloproteinasen (MMP's), die auch als Matrixine bekannt sind, sind Proteinase, die in der extrazellulären Matrix an vielen Umbau- und Abbauvorgängen beteiligt sind. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden die Aktivitäten von MMP's auf der Ebene der Transkription, auf der Ebene der Aktivierung zymogener Vorläufer der sogenannten Pro-MMP's, sowie aber auch auf der Ebene der Hemmung durch endogene Inhibitoren wie z.B. Gewebeinhibitoren, Metalloproteinasen selbst und den TIMP's reguliert (*Hijova*, 2005). Die MMP's besitzen zudem eine große Variabilität, durch Intervention in komplexe Vorgänge

unter pathophysiologischen Bedingungen einzugreifen. Die Rolle der MMP's in der Pathologie kann in folgende Typen eingeteilt werden: (1) Gewebezerstörung, wie in der Krebsinvasion und Metastasenbildung, der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis, verschiedenen Arten von Zahnfleisch- und Zahnerkrankungen, Gehirnverletzungen und neuroinflammatorischen Erkrankungen, (2) Fibrose, wie Leberzirrhose, Lungenfibrose, Atherosklerose, Multiple Sklerose, (3) Schwächung der Matrix, wie die dilatative Kardiomyopathie, Epidermolysis bullosa, Aortenaneurysma und Restenose-Läsionen, eingeteilt werden (*Amălinei et al, 2010*).

Im Sinne der zahnmedizinischen Betrachtungen sind vor allem die Mechanismen der MMP's interessant, mit welchen sie in die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge der Mundhöhle und der Zähne eingreifen können. So ist die Lokalisation der MMP's nach der abgeschlossenen Zahnentwicklung immer noch nicht vollständig geklärt, obwohl es momentan einige vielversprechende neue Erkenntnisse gibt (*Boushell et al., 2008*). Es wird somit vermutet, dass sie sich als inaktive Vorstufen im Dentin befinden (*Martin-De Las Heras et al., 2000*). Außerdem wird momentan auch darüber spekuliert, dass die im Dentin gebundenen MMP's, z.B. durch Lösen dentingebundener Wachstumsfaktoren, eine mitwirkende Rolle während regenerativer Vorgänge und bei der Regulierung der komplexen Dentin-Pulpa-Abwehrreaktionen bei kariösen Läsionen spielen könnten (*Tjäderhane et al., 1998; Sulkala et al., 2002*)

Die Aktivierbarkeit von MMP's, die seit ihrer Synthetisierung und Sezernierung in die mineralisierte Dentin-Matrix bei der Dentinogenese eingeschlossen waren, zeigt unter anderem die unglaubliche Stabilität und Langlebigkeit dieser Enzyme (*Kato et al., 2011*).

An diese wissenschaftliche These von *Kato et al., (2011)* knüpfen auch die Überlegungen zu dieser wissenschaftlichen Studie an. Ziel dieser Arbeit war es, in einem ersten Schritt, eine unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische enzymatische Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne nachzuweisen.

5.2.1 Diskussion über unterschiedliche Lagerungsmedien

Die Literaturstudie zum Thema Lagerungsmedien zeigt, dass die Lagerungszeit in einem entsprechenden Lagerungsmedium einen entscheidenden Einfluss auf die zu untersuchende Variable hat. Je kürzer z.B. der Lagerungszeitraum ist, desto geringer ist die entsprechende Beeinflussung der zu messenden Variable (*Jameson et al., 1994*). Dieses Ergebnis in punkto Lagerungszeit spiegelt auch eine andere Studie wieder, in welcher über einen Lagerungszeitraum von 7 bzw. 30 Tagen, sowie 6 Monaten der dentinadhäsive Haftverbund nach Lagerung in 0,2%iger Thymollösung und 10%iger Formalinlösung getestet wurde. So konnte im Ergebnis kein signifikanter Unterschied zwischen der Lagerungszeit von 7 und 10 Tagen, wohl aber für den Lagerungszeitraum von 6 Monaten für beide Lagerungsmedien

nachgewiesen werden (*Santana et al., 2006*). Die meisten in der Literatur gefundenen Studien beschäftigen sich mit der Beeinflussung des dentinadhäsiven Haftverbundes, den Scherkräften und der Mikrohärtigkeit des Dentins (*Dewald, 1997*). Häufig werden die Lagerungsmedien Thymol (*Retief et al., 1989; Haller et al., 1993; Moura et al., 2004; Kaul et al., 2014*), Formalin (*Haller et al., 1993; Moura et al., 2004; Tosun et al., 2007*) und Ethanol (*Haller et al., 1993; Retief et al., 1989*) untersucht. Dabei zeigen die Ergebnisse der Studien oft gleiche Tendenzen, aber auch manchmal Unterschiede.

In der durchgeführten Untersuchung wurden die Lagerungsmedien normales Leitungswasser (H₂O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige sowie 1%ige Thymollösung und als weiteres Lagerungsmedium eine Tiefkühlung der entsprechenden Präparate bei -28°C auf ihre Beeinflussung der enzymatischen Aktivität am Dentin-Hartmaterial getestet. Dabei wurden die Proben über einen Zeitraum von insgesamt 65 Tagen im entsprechenden Lagerungsmedium gelagert. Insgesamt wurden zwei Versuchsansätze der Testung gewählt. Entscheidender Unterschied beider Versuchsansätze ist der Kontakt der zu untersuchenden Dentin-Oberfläche mit dem Lagerungsmedium.

Im Ergebnis der Auswertungen der beiden Versuchsansätze für die Verwendung entsprechender Lagerungsmedien stellt sich die Frage nach dem Lagerungsmedium, welches sich für die Untersuchung der Zielfragen der Bestimmung enzymatischer Aktivität mit Hilfe der EnzChek® - Methode nun am besten eignet. Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer enzymatischen Aktivität, am Wurzeldentin von humanen Zähnen. Der Unterschied in den beiden Versuchsansätzen lag nun darin die zu untersuchenden Wurzel-Dentin-Oberflächen jeweils unterschiedlichen Lagerungsmedien über einen definierten Zeitraum auszusetzen. Dabei hatten die Proben (Wurzel-Dentin-Scheiben) des *Versuchsansatzes 1* über den gesamten Lagerungszeitraum direkten Kontakt mit dem Lagerungsmedium. Bereits (*Ziskind et al., 2003*) konnte nachweisen, dass sich das entsprechende Lagerungsmedium durch den Kontakt mit dem zu untersuchenden Gewebe nachteilig auf die zu untersuchende Variable oder das Gewebe selbst auswirken könnte. Als gewisse Kontrollgruppe dienen die Proben des *Versuchsansatzes 2*, in welchen die Wurzeldentin-Oberflächen keinen so langen direkten Kontakt mit dem Lagerungsmedium hatten, da die zur Enzymbestimmung nötigen Proben erst kurz vor der eigentlichen Messung aus der kompletten Zahnwurzel gesägt wurden und bis zu Untersuchung also weniger als 24 Stunden mit dem Lagerungsmedium Kontakt hatten.

Die dargestellten Ergebnisse der Untersuchung mit den Lagerungsmedien zeigen nicht eindeutig, dass ein unterschiedlich langer Kontakt eines Lagerungsmediums mit der Dentineoberfläche einer Probe, eine Beeinflussung der relativen enzymatischen Aktivität im Wurzel-Dentin bewirkt haben könnte. Die Unterschiede sind nicht regelhaft und deuten daher eher auf eine unterschiedlich hohe Volatilität der Einzelwerte, also der vorhandenen und aktivierten MMP's innerhalb des Wurzel-Dentins, hin. Unterschiede zwischen den einzelnen

Lagerungsmedien und Versuchsansätzen konnten jedoch nicht gefunden werden. Als Ergebnis kann aber formuliert werden, dass 0,1%ige Thymollösung als Lagerungsmedium nicht als ungünstig erscheint, alternativ aber auch 70%iger Alkohol und das Einfrieren der Proben als Lagerungsmedium in Betracht gezogen werden können. 1%ige Thymollösung hemmt die Enzymaktivitäten nicht vollständig, ist jedoch für andere Untersuchungen, z.B. zur Adhäsivtechnik ungeeignet. Die Verwendung von Wasser birgt ein Kontaminationsrisiko. Für weitere Untersuchungen und eine eventuelle Ausdehnung der Fragestellung über die Aktivität von MMP's am Dentin-Hartmaterial sollte aber der Kontakt des Lagerungsmediums mit der Dentin-Oberfläche möglichst kurz gehalten werden. Mit der gewählten Untersuchungsmethode Enz-Check® sollte durch die Enzymaktivität auf die Enzymkonzentration der MMP's innerhalb des Kollagenverbandes des Wurzel-Dentins humaner Zähne geschlossen werden. Dem Prinzip des Testansatzes zur Folge, sollen aus der dreidimensionalen Kollagen-Matrix-Struktur des Wurzel-Dentins durch Demineralisierung die enthaltenen MMP's freigesetzt werden, deren Aktivität dann mit einer substratspezifischen Fotoreaktion nachgewiesen wird. Aus den Messwerten lässt sich dann rechnerisch die relative enzymatische Aktivität der MMP's im Wurzeldentin berechnen. Demzufolge sollte das Lagerungsmedium für das gewählte Testverfahren (*Enz-Check®*) eine direkte Beeinflussung der Kollagenmatrix des Wurzeldentins und vor allem eventuell herausgelöster MMP's selbst vermeiden oder den Einfluss so gering wie möglich halten. Des Weiteren sollte das Lagerungsmedium eine desinfizierende und in gewisser Weise auch eine konservierende Wirkung haben. Eine Beeinflussung der Messwerte durch eine eventuelle bakterielle Besiedelung oder Verunreinigung durch Pilze sollte gerade im Hinblick auf Enzymmessungen unbedingt vermieden werden.

In der Literatur lassen sich momentan keine Studien finden, die sich mit einem Einfluss des Lagerungsmediums in Bezug auf Enzymmessungen finden. Hinsichtlich eines Einflusses der Lagerungsmedien werden aber die verschiedensten Lagerungsmedien wie destilliertes Wasser, Formalin-Lösungen in unterschiedlichsten Konzentrationen, physiologische Kochsalzlösung, 0,1%ige Thymollösung und Wasserstoffperoxid in Zusammenhang mit der dentinadhäsiven Haftkraft und der Dentinpermeabilität beschrieben (*Goodis et al., 1991, 1993; Ziskind et al., 2003*).

Grundlegend erfolgte die Auswahl der Lagerungsmedien in dieser Studie danach, ob sie ein desinfizierendes Wirkspektrum aufzuweisen hatten, so 70%iger Alkohol, 0,1%ige Thymollösung, 1%ige Thymollösung. Als Vergleichslagerungsmedium wurde normales Wasser gewählt. Als weiteres Lagerungsmedium diente die Frostlagerung der Proben bei - 28°C. Der Einfluss von Lagerungsmedien auf die zu untersuchende relative enzymatische Aktivität im Wurzeldentin von humanen Zähnen wurde mit diesen Lagerungsmedien getestet. In den nachfolgenden Punkten wird der vermutete Einfluss diskutiert.

5.2.1.1 Lagerungsmedium Wasser

Zur Lagerung der entsprechenden Proben der beiden Versuchsansätze wurde jeweils normales Leitungswasser verwendet. Die durchschnittlichen relativen enzymatischen Aktivitätswerte betragen $9.46 \mu U$ pro mg Dentin bei den gelagerten Dentin-Scheiben und bei den gelagerten Zähnen $10.74 \mu U$ pro mg Dentin. Damit liegen die gemessenen enzymatischen Aktivitäten im Vergleich zu den anderen Lagerungsmedien im unteren Bereich. Bei der Lagerung der Proben in reinem Wasser, läge die Vermutung einer Verunreinigung oder Besiedelung der Dentinoberflächen mit Bakterien und Pilzen nahe, da Wasser keine desinfizierende Wirkung besitzt. Mit den enzymatischen Werten, die ja im unteren Messbereich angesiedelt sind, kann von einem störenden Einfluss einer Verunreinigung nicht ausgegangen werden, da die Werte sonst höher hätten sein müssen. Dies spricht aber für ein genaues und sauberes Vorgehen bei der Herstellung der einzelnen Dentin-Scheiben und für eine Wasserqualität von entsprechender Güte. Trotzdem sollte eine Lagerung der Proben in Wasser und auch in Kochsalzlösung eigentlich nicht zum Tragen kommen. So konnte durch *Goodis et al., (1991)* eine Zunahme der Permeabilität von Dentin durch Kochsalzlösung nachgewiesen werden. In einer ähnlichen Untersuchung konnte durch *Goodis et al., (1993)* nachgewiesen werden, dass sich Kochsalzlösung nicht als Lagerungsmedium für Untersuchungen der Dentinpermeabilität und des dentinadhäsiven Haftverbundes eignet. *Strawn et al., (1996)* führten Untersuchungen zur Oberflächenchemie und damit zur Veränderung an der Dentin-Oberfläche an Dentinproben durch, die in den verschiedensten Lagerungsmedien gelagert wurden. So konnten *Strawn et al., (1996)* durch diese Studie nachweisen, dass eine wenn auch sehr kurzfristige Lagerung in Wasser, Kochsalzlösung, Ethanol oder Formalin und Thymol eine geringfügige Änderungen in der Oberflächenchemie humanen Dentins bewirkt werden kann. In einer weiteren Studie von *Tosun et al., (2007)* wurde nachgewiesen, dass in 0,1%iger Thymollösung gelagerte humane Dentinproben über einen Lagerungszeitraum von 2 Monaten, gegenüber in destilliertem Wasser gelagerte, niedrige Mikroscherkräfte besaßen. Dabei beeinflusst der Lagerungszeitraum die Veränderungen der Werte der Mikroscherkräfte, obwohl sich zwischen den beiden Messzeitpunkten je Lagerungsmedium keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten (*Tosun et al., 2007*).

Eine mikrobiologische Untersuchung des Wassers vor Einlagerung der Proben durch das Labor für Umwelthygiene (*Hanshagen, MV, Deutschland*) hat bei 36°C eine Verunreinigung des Wassers von 8 KBE/ml (*koloniebildende Einheiten*) bei einem Grenzwert laut Trinkwasserverordnung von 100 KBE/ml ergeben. Obwohl die Lagerungsmedien nach der Lagerung in unseren Versuchsansätzen klar waren und eine sichtliche Verunreinigung nicht stattgefunden haben kann, könnte jedoch eine eventuelle mikrobakterielle Besiedelung der

Dentin-Scheiben, welche im Nachhinein die enzymatische Messung negativ beeinflusst haben könnte, für die unterschiedlichen Werte ursächlich sein. Ebenso gut könnte der längere Kontakt der Dentinoberfläche mit Wasser zu einer Hydrolyse der Kollagenmatrix und somit zu einer Vermehrten und tieferen Freilegung der MMP's und oder somit auch zum Verlust dieser geführt haben. Eine Lagerung der Dentinproben in reinem Wasser oder auch in destilliertem Wasser kann demzufolge durch die hier durchgeführten Untersuchungen nicht empfohlen werden.

5.2.1.2 Lagerungsmedium Frost (tiefgefroren bei -28°C)

Zur Lagerung der entsprechenden Proben der beiden Versuchsansätze wurden diese bei einer Temperatur von -28°C trocken, d.h. ohne den Zusatz irgendwelcher Stoffe, wie z.B. Wasser, eingefroren. Die gemessenen enzymatischen Aktivitätswerte der eingefrorenen Proben liegen im Mittel von $10,82 \mu U$ pro mg Dentin bei den gelagerten Dentin-Scheiben im mittleren Bereich aller gemessenen enzymatischen Aktivitäten, währenddessen sie im Mittel von $18,05 \mu U$ pro mg Dentin bei den gelagerten Zähnen auf einem sehr hohen Niveau liegen.

Die höhere enzymatische Aktivität in den Proben des *Versuchsansatzes 2* lässt sich eigentlich nur durch eine eventuelle Kontamination oder Verunreinigung der Dentin-Oberflächen vor dem Einfrieren erklären, die dann nach dem Auftauen zu einer dementsprechenden Veränderung an der Dentinmatrix geführt haben könnten. In der Literatur konnte eine Studie ausfindig gemacht werden, die sich mit dem Lagerungsmedium Frost (*Einfrieren der Proben*) beschäftigt hat. So haben *Titley et al., (1998)* die Beeinflussung der Scherbindungskräfte und des dentinadhäsiven Haftverbundes durch bestimmte Lagerungsmedien untersucht. Im Ergebnis dieser Studie wurde festgestellt, dass Thymol und Alkohol zu signifikant auffällig niedrigeren Scherbindungsfestigkeiten und somit zu atypischen Verläufen des dentinadhäsiven Haftverbundes führen. Als bevorzugte Lagerung der Proben wurde in der Studie von *Titley* das Einfrieren von Proben definiert. Als nachteilig wurde jedoch gleichzeitig festgehalten, dass diese Lagerungsmethode die Zähne bzw. Proben nicht dekontaminiert (*Titley et al., 1998*).

In einer Studie von *Kaul et al., (2014)* zeigten sich bei Laserfluoreszenzmessungen signifikante Unterschiede über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr. Lagerungsmedien waren unter anderem Thymol, Chloramin, Formalin, Speichel und gefrostete Proben. Dabei kam es während der ersten 30 Tage zu einem maximalen Rückgang der Fluoreszenz, während dessen für die gefrosteten Proben über den gesamten Lagerungszeitraum keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenz nachgewiesen werden konnten (*Kaul et al., 2014*). Trotz dieser Tatsache kann aber aufgrund der in dieser Studie vorliegenden Werte ein Einfrieren der Proben nicht als erste Wahl empfohlen werden, da eine desinfizierende Komponente bei der Lagerung fehlt und weil die enzymatischen Werte zwischen beiden Versuchsansätzen stark variieren. Als mögliche Erklärung für die niedrigen enzymatischen Aktivitätswerte des

Versuchsansatzes 1 könnten Veränderungen der Kollagen-Matrix durch Austrocknung und Brüchigkeit in Frage kommen. Diese Veränderungen können eventuell für eine verminderte Freisetzung oder einer Zerstörung der in der Kollagen-Matrix gebundenen MMP's und damit auch für die verminderten enzymatischen Werte ursächlich sein. Da die Proben des *Versuchsansatzes 2* erst kurz vor der eigentlichen enzymatischen Testung gesägt und gefertigt wurden, sollte die Ursache für die unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten aber schon an Reaktionen bzw. Veränderungen an der Dentinoberfläche während des Lagerungszeitraumes zu suchen sein.

5.2.1.3 Lagerungsmedium 70%iger Alkohol

Ethanol ist eine organisch chemische Verbindung aus Kohlenstoff und Wasserstoff mit der Summenformel C_2H_6O oder C_2H_5OH . Das wichtigste Strukturmerkmal des Ethanols ist die Hydroxyl-Gruppe (-OH). Durch die unterschiedliche Anziehung von Elektronen durch das Sauerstoffatom gegenüber Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen kommt es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Elektronendichte, sodass ein Dipol entsteht. Aufgrund dieser Dipol-Eigenschaften sind sie besonders mit anderen Dipolen mischbar, insbesondere mit Wasser. Des Weiteren besitzt Alkohol einen organischen Rest, der sich hervorragend dazu eignet sich mit lipophilen Stoffen oder Verbindungen zu mischen. Für die Studie wurde zur Lagerung der entsprechenden Proben dieser Testgruppe jeweils 70%iger Alkohol verwendet. Der Vergleich der enzymatischen Aktivitätswerte der beiden Versuchsansätze zeigt, dass in den Proben des *Versuchsansatzes 1* im Mittel mit $11,97 \mu U$ pro mg Dentin die höheren enzymatischen Werte gegenüber denen des *Versuchsansatzes 2* mit $9,99 \mu U$ pro mg Dentin zu finden sind. Alkohole besitzen besonders in höheren Konzentrationen die Fähigkeit Proteine zu denaturieren (*McDonnel and Russel, 1999*). Dies würde die Tatsache erklären, dass eine längere Lagerung der Proben in 70%igen Alkohol höhere enzymatische Werte, aufgrund der Denaturierung der Kollagenmatrix und damit auch einer erhöhten Freisetzung von MMP's bewirken müsste. So konnten *Goodis et al., (1991)* in ihrer Studie über die Beeinflussung der Dentinpermeabilität nachweisen, dass Alkohol in der ersten Zeit des Kontaktes mit dem Dentin, eine sehr starke Zunahme der Dentinpermeabilität verursacht, während dessen mit fortschreitender Lagerung, diese wieder abnimmt. Diese Zeit wurde aber nicht genauer definiert. Da die Lagerungszeiten der Dentinproben des *Versuchsansatzes 2* im Lagerungsmedium 70%iger Alkohol extrem kurz waren, könnte dies ein Indiz dafür sein, dass eine Denaturierung der Kollagenmatrix und damit eine erhöhte Freisetzung von MMP's noch nicht in dem Maße fortgeschritten war, wie in den Proben des *Versuchsansatzes 1*, die eine wesentlich längere Lagerungszeit aufweisen konnten.

Andere Studien zeigen ein ähnliches Ergebnis, wo bei der Prüfung auf Veränderung oder Beeinflussung der Scherfestigkeit am Dentin zwischen den Werten der Proben der

Lagerungsmedien 0,05%ige Thymollösung und 70%iger Alkohol keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten (*Retief et al., 1989*).

Alkohol in Konzentrationen von 50% bis 70% und höher besitzt, wie oben schon beschrieben, denaturierende Eigenschaften auf Bio-Polymere durch Störung der entsprechenden Wasserstoffbrückenbindungen (*McDonnel und Russel, 1999*). Dadurch kann es zu einer Störung und Auflösung der Raumstruktur von Proteinen kommen. Der 70%ige Alkohol könnte somit zu einer Hydrolyse der Kollagenmatrix an den Dentinoberflächen der Proben des *Versuchsansatzes 1* und damit zu einer Freisetzung von gebundenen MMP's mit einer gleichzeitig einhergehenden Inhibierung oder Spaltung dieser geführt haben. Während die Dentinoberflächen (Messflächen) der Proben des *Versuchsansatzes 1* über den gesamten Lagerungszeitraum der Alkoholwirkung ausgesetzt waren, sind die Dentinoberflächen (Messflächen) der Proben des *Versuchsansatzes 2* nur relativ kurze Zeit mit dem Lagerungsmedium in Kontakt gekommen. Der unterschiedliche Denaturierungsgrad der Kollagenmatrix des Wurzel-Dentins und eine damit einhergehende erhöhte Freisetzung, aber auch vorstellbare Denaturierung der MMP's in den beiden Versuchsansätzen könnten eine Erklärung für die unterschiedlichen Messwerte sein.

Da dem Alkohol allgemein eine desinfizierende Wirkung zugeschrieben wird, kann bei der Erklärung der Unterschiede in der enzymatischen Aktivität der beiden Versuchsansätze zumindest die Ursache einer Verunreinigung und Besiedelung durch eventuelle Bakterien oder Pilze über den Lagerungszeitraum im Lagerungsmedium ausgeschlossen werden. Zu diskutieren wäre wie immer eine Verunreinigung der Proben (Dentin-Scheiben) durch unsachgemäße Handhabung oder Verunreinigung während der Versuchsdurchführung.

5.2.1.4 Lagerungsmedium 0,1%ige und 1%ige Thymollösung

Thymol ($C_{10}H_{14}O$) ist ein natürlicher Bestandteil des Thymianöls und zählt als Wirkstoff zur Gruppe der ätherischen Öle. Es ist in Wasser sehr schwer und in hochprozentigem Alkohol (Ethanol 96%) sehr gut löslich. Dem Thymol werden desinfizierende, fungizide und bakterizide Wirkungen zugeschrieben. Das für diesen Versuch verwendete Lagerungsmedium besteht in seiner Zusammensetzung aus 0,1% Thymol, d.h. 0,1 g Thymol befinden sich in 99,9 g Lösung, wobei die Lösung aus 10% Ethanol (96%) ad 100% Aqua purificata, also 10 ml vom Ethanol und 90 ml vom Aqua purificata besteht. In der 1%igen Thymollösung sind die Bestandteile dementsprechend verändert (1 g Thymol befinden sich in 99 g Lösung), wobei die Lösung aus 70% Ethanol (96%) und 30 ml vom Aqua purificata besteht. Der hohe Bestandteil an Alkohol im Lagerungsmedium wurde notwendig um das Thymol vollständig zu lösen.

Während 70%iger Alkohol und 1%ige Thymollösung, die zu einem sehr großen Anteil ebenfalls aus Alkohol (96%) besteht, einen verändernden Einfluss auf die Kollagenmatrix des Wurzel-Dentins, unter anderem durch geringere dentinadhäsive Haftwerte, haben (*Titely et al.,*

1998), empfiehlt sich als wahrscheinlich ideales Lagerungsmedium 0,1%ige Thymollösung, da der Anteil von Alkohol sehr gering ist. In den Studien die in der Literatur gefunden wurden, werden Thymol-Lösungen in unterschiedlichsten Konzentrationen als Lagerungsmittel verwendet. So wurden z.B. Konzentrationen von 0,01% (*Moura et al., 2004*), 0,02% (*Kaul et al., 2014*), 0,05% (*Retief et al., 1989*) und 0,1% (*Haller et al., 1993; Ziskind et. al., 2003*) verwendet. In der Studie von (*Retief et al., 1989*) konnte im Vergleich der Lagerungsmedien in Bezug auf die Beeinflussung der dentinadhäsiven Scherfestigkeit, zwischen 0,05%iger Thymollösung und 70%igem Alkohol kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Beide Lagerungsmedien zeigten aber eine geringere Signifikanz gegenüber Speichel und Chloramin/Formalinlösung.

In den Proben des *Versuchsansatzes 1* (gelagerte Dentin-Scheiben) wurden für das Lagerungsmedium 0,1%ige Thymollösung enzymatische Aktivitätswerte im Mittel von $11,09 \mu U$ pro mg Dentin und für den *Versuchsansatz 2* Werte im Mittel von $16,35 \mu U$ pro mg Dentin gefunden. Dagegen lagen die enzymatischen Werte für das Lagerungsmedium 1%ige Thymollösung für die gelagerten Dentinscheiben im Mittel bei $9,05 \mu U$ pro mg Dentin und für die gelagerten Zähne im Mittel bei $12,87 \mu U$ pro mg Dentin. Während die enzymatischen Aktivitätswerte für die gelagerten Dentin-Scheiben im mittleren Bereich lagen, sind die enzymatischen Werte für die gelagerten Zähne im höheren Bereich der Messwerte angesiedelt. Die unterschiedlichen Messwerte der enzymatischen Aktivität lassen sich wahrscheinlich durch die hohen Alkoholkonzentrationen in der 1%ige Thymollösung und damit durch ihren Einfluss auf die Kollagenmatrix des Dentins erklären.

Es ist in der Literatur keine Studie zu finden die sich explizit mit dem Thema Lagerungsmedium und Enzymkonzentration oder Enzymaktivität beschäftigt. Dagegen gibt es unzählige Studien die einen Einfluss des Lagerungsmediums auf den adhäsiven Verbund untersucht haben. So konnte *Retief et al., (1989)* eine Abnahme der dentinadhäsiven Bindungskraft nach der Lagerung der Proben in Thymol herausfinden. In einer Studie von *Haller et al., (1993)* wurde der Einfluss der Lagerungsmedien auf die Entstehung von Mikrorissen bei dentinadhäsiv gelegten Füllungen untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Ergebnisse aus den in 0,1%iger Thymollösung gelagerten Proben in etwa den Ergebnissen der Kontrollgruppe entsprachen. Wie schon beim Lagerungsmedium Alkohol beschrieben, könnte es durch Hydrolyse der Kollagenmatrix des Wurzeldentins zu einer Freisetzung der in ihr gebundenen MMP's gekommen sein. Erklärungen für diese Tendenz liefern wahrscheinlich wieder die Bestandteile des Lagerungsmediums selbst, da mit einem hohen Anteil von Thymol und einem hohen Anteil von Alkohol, Substanzen und Verbindungen vorliegen die Proteine denaturieren können (*McDonnel and Russel, 1999*) die letztendlich zu einer Veränderung der enzymatischen Aktivität hatten führen können. Somit könnte sich so die geringere enzymatische Aktivität in den Proben des *Versuchsansatzes 1* erklären lassen.

Aus den Versuchen der hier durchgeführten Studie lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination einer geringen Menge von Thymol (0,1%) in Ethanol gelöst und in eine wässrige Lösung (Aqua purificata) eingebracht einen ausreichenden desinfizierenden Schutz bietet. So wird Thymol häufig Lagerungsmedien für Zähne oder Zahnbestandteile als antibakterieller Zusatz zugesetzt (*Goodis et al., 1991, 1993*).

5.2.1.5 Schlussfolgerungen Lagerungsmedium

Aus der Literatur geht hervor, dass es für die Lagerungsmedien und seine Bedingungen momentan keinen einheitlichen Standard gibt (*Strawn et al., 1996*). Zähne oder Zahnbestandteile sind, hinsichtlich ihrer Lagerung durch das Lagerungsmedium in ihrer Struktur und in ihrer chemischen Zusammensetzung, Veränderungen unterworfen (*Watanabe und Nakabayashi, 1994*).

Als Lagerungsmedium für die Lagerung von Zähnen und Zahnbestandteilen, die für die Hauptversuche dieser Arbeit verwendet werden sollen, empfiehlt es sich 0,1%ige Thymollösung zu verwenden. Zusätzlich wurde festgelegt, auf die lange Lagerung von Dentin-Scheiben zu verzichten und anstatt dessen den kompletten Zahn bzw. die gereinigte komplette Zahnwurzel zu lagern und die zur enzymatischen Messung benötigten Dentin-Scheiben erst kurz vor der enzymatischen Untersuchung selbst herzustellen. Die zur enzymatischen Messung bestimmten Dentin-Scheiben sollen somit einem langen Lagern im Lagerungsmedium entzogen werden, um die äußere Beeinflussung so gering wie möglich zu halten. Zusätzlich sollten die Proben nach der Herstellung und vor der eigentlichen Lagerung gründlich in Aqua destillata z.B. auf einem Rüttler gewaschen werden, um eine eventuelle Kontamination mit Bakterien und anderen Verunreinigungen zu vermeiden. Untermauert wird die These durch die Ergebnisse einer Studie von *Jameson et al., (1994)*, in welcher festgestellt wurde, dass eine Lagerung von Zähnen zu Wasserverlust und Schrumpfsreaktionen bzw. zu einer Dimensionsänderung führt, die aber durch Rehydration zurückgewonnen werden kann. Je kürzer also die Lagerungszeit, desto geringer fällt die Beeinflussung aus. Es wird also eine kurze Lagerungszeit empfohlen.

Erklärungen für diese Tendenz liefern wahrscheinlich wieder die Bestandteile des Lagerungsmediums selbst da mit einem hohen Anteil von Thymol und einem hohen Anteil von Alkohol, Substanzen und Verbindungen vorliegen die Proteine denaturieren können (*McDonnel and Russel, 1999*) und somit zu einer Veränderung der enzymatischen Aktivität führen können.

5.2.2 Diskussion: UG 1 (endodontisch behandelten Zähne)

In dieser Untersuchungsgruppe wurden ausschließlich Dentin-Scheiben aus dem

Wurzeldentin endodontisch behandelter Zähne auf eine vorhandene gelatinolytische und kollagenolytische enzymatische Aktivität untersucht. Die enzymatischen Testungen wurden nach Entfernung des Kronendentins inklusive der Schmelzanteile, der Wurzelfüllung und des Wurzelzementes ausschließlich am reinen Wurzel-Dentin durchgeführt. Dabei wurde bewusst auf eine Partikularisierung des Dentins, wie schon mehrfach erwähnt verzichtet. Ausgangspunkt der Überlegungen waren die Thesen von (*Tjäderhane et al., 1998, Martin-De Las Heras et al., 2000, Sulkala et al., 2002*), die eine Lokalisierung von MMP's im Dentin vermuten und von *Kato et al., (2011)*, der von einer Aktivierung dieser auch nach Jahren der Inaktivität ausgeht. In der Literatur ist es nicht ersichtlich, welche Dentinanteile der Zähne jeweils in den einzelnen Untersuchungen auf eine enzymatische Aktivität getestet wurden. Am wahrscheinlichsten ist es aber, dass das Kronendentin getestet wurde. In Bezug auf die Aktivierbarkeit von im Wurzel-Dentin eingeschlossenen MMP's ist die Studienlage in der Literatur relativ dünn.

So untersuchten z.B. *Kramer et al., (2008)* in einer Kohortenstudie die Anfälligkeit von endodontisch behandelten Zähnen in Bezug auf vertikale Wurzelfrakturen. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass vertikale Wurzelfrakturen unabhängig sind von der Anwendung von Wurzelstiften, vom Zahntyp und der postendodontischen prothetischen oder konservierenden Versorgung, jedoch eine Abhängigkeit vom Alter des Patienten bei Behandlungsbeginn und dem Zeitpunkt der Wurzelfüllung aufweisen (*Kramer et al., 2008*).

Die Ergebnisse lassen durchaus die Vermutung offen, dass es neben bestimmten mechanischen Gründen für die Wurzelfrakturen, durchaus auch zu Frakturen der Wurzel durch eine Schwächung der Kollagenmatrix des Dentins durch MMP-Degradation kommen könnte. Einen weiteren Anlass dazu gibt eine Studie von *Ferrari et al., (2004)*. In dieser *In-vitro* Studie konnten *Ferrari et al.* nachweisen, dass sich signifikante Unterschiede in der Degradation der Kollagen-Matrix im Bereich des Wurzeldentins bei endodontisch behandelten und mit Wurzelstiften, versorgten Zähnen, welche jeweils mit Zinkphosphat Zement eingesetzt waren, über einen längeren klinischen Alterungszeitraum ergeben haben. Über diesen Zeitraum kam es zu einer Auflösung der strukturellen Integrität der Kollagen-Matrix im Wurzeldentin, wobei über die Zersetzung der Matrix entweder durch bakterielle Besiedelung und deren Abbauprodukten oder durch eine Aktivierung wirtseigener MMP's nur Vermutungen angestellt werden konnten (*Ferrari et al., 2004*).

Säurehaltige Zemente wie z.B. Zinkphosphat Zement, haben zum Teil selbstätzende Eigenschaften, die in unterschiedlichen Graden, bei der Entfernung der Schmierschicht in der Lage sind, eine enge Anpassung an die Dentineoberfläche durch Entmineralisierung zu bewirken (*Shimada et al., 1999*). Demzufolge kann auch hier, bei durchaus nicht adhäsiven Maßnahmen und Behandlungen, nach diesen Erkenntnissen aus der Literaturübersicht, über

eine Degradation der Kollagen-Matrix des Wurzel Dentins durch säureaktivierte MMP's spekuliert werden.

Diese Tatsache wurde bei den Untersuchungen dieser Studie nachempfunden, indem die Oberfläche der einzelnen Dentinscheiben mit *0,5 M EDTA-Lösung* für 10 min demineralisiert wurde, was zweifellos zu einer Säureaktivierung der im Dentin eingeschlossenen MMP's bzw. zur Aktivierung der entsprechenden pro-MMP's geführt hat. Durch die Umsetzung von fluoreszenzmarkiertem Substrat, mittels der EnzChek®-Methode, nachgewiesen durch eine entsprechende Fluoreszenzänderung, konnte eine gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität aufgezeigt werden. Da das eingesetzte fluoreszenzmarkierte Substrat (*Gelatine*) aber von verschiedenen MMP's versoffwechselt werden kann, muss man hier vorerst von einer unspezifischen enzymatischen Aktivität ausgehen. Es konnte durch die Versuchsreihe dementsprechend der Nachweis einer unspezifischen gelatinolytischen und kollagenolytischen Aktivität innerhalb des Wurzel Dentins erbracht werden.

Durch nachgelagerte Untersuchungen, wie z.B. mit Hilfe zymographischer Methoden, könnte jetzt diese vorhandene unspezifische Aktivität, entsprechenden MMP's zugewiesen werden.

5.2.2.1 Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 1

Da die Dentin-Scheiben aus unterschiedlichen Abschnitten des Wurzel-Dentins (*koronal, medial und apikal*) entnommen wurden, bestand ein weiterer Versuchsansatz dieser Studie darin, Anhaltspunkte über die Lokalisation der MMP's innerhalb des Wurzel-Dentins zu finden. Im Ergebnis dessen, konnten in allen Schnittebenen (*koronal, medial und apikal*) einer Probe, MMP's unterschiedlicher Konzentration bzw. Aktivität, nachgewiesen werden. Unmittelbar nach erfolgter zweistündiger Inkubation bei 37°C, also zum Zeitpunkt $t = 120$ min nach Reaktionsansatz, war die höchste enzymatische Aktivität in allen Proben zu finden. Diese fiel jedoch bis zum Mess-Zeitpunkt $t = 240$ min (*nach Reaktionsansatz*) kontinuierlich in allen Proben wieder ab. Auffällig ist, dass dieser Abfall in der enzymatischen Aktivität parallel in allen Proben zu beobachten war. Daraus lässt sich letztendlich schließen, dass unterschiedliche enzymatische Aktivitäten (aktivierte MMP's) in den einzelnen Proben vorhanden sein müssen. Der beschriebene Verlauf der Änderung der enzymatischen Aktivität gilt sowohl für die Einzelproben im zeitlichen Verlauf je Schnittebene, als auch für die enzymatischen Werte auf das gesamte Wurzel-Dentin bezogen. Dies bestätigen auch die entsprechenden Mittelwerte der enzymatischen Aktivität bezogen auf alle Mess-Zeitpunkte, die mit einem Wert von $9,06 \mu U$ pro mg Dentin für die koronale Schnittebene, mit $9,76 \mu U$ pro mg Dentin für die mediale Schnittebene und mit $11,23 \mu U$ pro mg Dentin für die apikale Schnittebene ermittelt wurden. Der kontinuierliche Abfall der enzymatischen Aktivität bezogen auf den Mess-Verlauf lässt auf einen gleichmäßigen Verbrauch des fluoreszenzmarkierten Substrates schließen. Dabei scheint sich bei der eigentlichen Reaktion

durch die MMP's, ein chemisches Gleichgewicht eingestellt zu haben. Denkbare Ursache für den Abfall der enzymatischen Aktivität im Mess-Verlauf wäre allerdings auch die Tatsache einer kontinuierlichen Inaktivierung der MMP's. Auszuschließen ist jedoch ein Verbrauch des Substrates, da diese Tatsache einen sofortigen Abbruch der Reaktion und damit einen sprunghaften Abfall der enzymatischen Aktivität bedeuten würde.

Die unterschiedlichen Niveaus der enzymatischen Aktivitäten in den einzelnen Dentin-Scheiben lassen auf eine unterschiedliche Menge an aktivierten oder vorhandenen MMP's innerhalb der Wurzel-Dentin-Matrix schließen. Die statistische Varianzanalyse mit Hilfe des *gepaarten T-Testes* hat zwischen den einzelnen Schnittebenen zu den entsprechenden Mess-Zeitpunkten jeweils immer einen signifikanten statistischen Zusammenhang nachweisen können. So konnten zwischen der koronalen und der medialen Schnittebene mit dem *gepaarten T-Test* ($p = 0,0079$ bis $p = 0,0084$), der koronalen und der apikalen Schnittebene mit dem *gepaarten T-Test* ($p = 0,0067$ bis $p = 0,0072$) und zwischen der medialen und apikalen Schnittebene mit dem *gepaarten T-Test* ($p = 0,0390$ bis $p = 0,0405$) signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Über eine Verteilung der MMP's innerhalb des Wurzeldentins von apikal nach koronal oder umgekehrt, können aufgrund unserer Untersuchung jetzt jedoch einige Vermutungen angestellt werden. Bei allen Schnittebenenpräparaten der einzelnen Proben dieser Untersuchungsgruppe konnte jeweils eine von koronal nach apikal ansteigende enzymatische Aktivität ermittelt werden. Dabei lagen jedoch die enzymatischen Werte innerhalb einer Schnittebene bei den einzelnen Proben jeweils auf einem sehr unterschiedlichen Niveau. Betrachtet man die enzymatische Aktivität zu den einzelnen Mess-Zeitpunkten, so ist innerhalb der einzelnen Proben mit zunehmender Zeit nach Inkubation eine Abnahme zu verzeichnen. Da die Fluoreszenzmessungen allerdings erst nach einer zweistündigen Inkubationszeit gemessen wurden kann über den Anstieg bzw. über den Ausgangswert der enzymatischen Aktivität keine Aussage getätigt werden.

Festzustellen ist zudem eine ausgesprochene Volatilität der entsprechenden enzymatischen Aktivitätswerte. Da die entsprechenden Zahn-Wurzeln, aus welchen die Dentin-Scheiben letztendlich gefertigt wurden, jeweils eine unterschiedliche Länge aufwiesen und somit die Schnittpräparate der einzelnen Schnittebenen nicht nach einer maßgetreuen Vorlage aus der Wurzel gefertigt werden konnten, ist die festgestellte einheitliche Tendenz umso bemerkenswerter.

Nimmt man an, dass im Dentin enthaltene MMP's durch säurehaltige Zinkphosphat Zemente (*Shimada et al., 1999, Ferrari et al. 2004*) oder andere Aktivierungsmechanismen aktiviert werden können, so kann man annehmen, dass es so zu einer verstärkten Degradation der Kollagenmatrix und somit zur Zerstörung des Wurzeldentins kommen kann. Mutmaßliche klinische Folgen könnten z.B. Wurzelfrakturen und Zahnfrakturen im Zahnhalsbereich oder

apikale parodontale Veränderungen (*Hernández Ríos et al., 2009, Sorsa et al., 2009*) an wurzelbehandelten Zähnen sein.

Da das entsprechende Alter der Wurzelfüllungen und das Patientenalter nicht bekannt waren, können über diese eventuellen Einflussfaktoren auf die enzymatische Aktivität keine Aussagen erhoben werden. Die hier entsprechend dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen können nur ein Einstieg die Thematik sein. Sie sollten als Grundlage für weitere forschende Versuchsansätze genutzt werden.

5.2.3 Diskussion: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne)

In dieser Untersuchungsgruppe wurden ausschließlich Dentin-Scheiben aus dem Wurzelentin nicht endodontisch behandelter Zähne auf eine vorhandene gelatinolytische und kollagenolytische enzymatische Aktivität untersucht. Entsprechend der Zielsetzung und Thematik dieser Arbeit, dienten die Proben dieser Untersuchungsgruppe, als Kontrollgruppe. Als erstes wurden die Zähne, wie im Punkt Material und Methoden beschrieben, einer labortechnischen Wurzelbehandlung unterzogen, um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die Enzymtestungen mit den anderen Gruppen zu schaffen. Labortechnisch bedeutet in diesem Fall, dass das Pulpengewebe mittels rotierender Feilen ohne chemische Gleitmittel, wie z.B. Calcinase-Lösung, oder Spüllösungen, wie z.B. Hypochlorid-Lösung oder Wasserstoffperoxid-Lösung, entfernt wurde. Als Spüllösungen diente ausschließlich physiologische Kochsalzlösung. Durch diese Behandlungsweise sollte der Wurzelkanalinnenraum möglichst schonend behandelt werden, um eventuell strukturelle Unterschiede im Wurzel-Dentin gegenüber der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne aufrecht zu erhalten oder nicht zu verwischen. Im Gegensatz dazu stand die Gruppe der endodontisch behandelten Zähne, die unter *In-vivo* Bedingungen einer endodontischen Behandlung unterzogen wurden. Für eine Diskussion und den Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungsgruppen untereinander, wären Informationen über den Zeitpunkt der *In-vivo* durchgeführten endodontischen Behandlung, ihre Durchführungsweise und der Zeitpunkt der Extraktion der Untersuchungszähne hilfreich gewesen. Da alle Zähne der Untersuchungsgruppen aus rein klinischen Aspekten, wie z.B. circuläre Osteolyse, apikale Veränderungen oder aus parodontalen Gründen entfernt wurden, wäre es auch hilfreich gewesen den Extraktionsgrund in die Diskussion mit einzubeziehen. Hintergrund dieser Überlegungen ist z.B. die Tatsache, dass die unterschiedlichen klinischen Gegebenheiten an den Zähnen, unterschiedliche Veränderungen oder Degradationen am Wurzelentin verursacht haben könnten. Ausreichende Hinweise für diese Überlegungen finden sich in der Literatur, wenn man biologische und klinische Aspekte über die MMP's in Hinsicht auf ihre Lage zum Dentin oder auf ihre Wirkungsweise an das Dentin grenzende Gewebe näher betrachtet. So zeigen einige Studien, dass die MMP's-1, -2, -9, -10, -11, -14, -15, -16, -19,

-20, -23 und zusätzlich die TIMP's-1, -2 und -3 sowohl von Odontoblasten als auch von Zellen des Pulpagewebes gebildet und exprimiert, während die MMP's-7, -8, -24 und -25 ausschließlich in Odontoblasten und MMP-13 und MMP-17 nur vom Pulpagewebe gebildet werden (*Palosaari et al., 2003*). Zusammenfassend spezifisch betrachtet, sind das fast ausschließlich Zellen, die sich innerhalb der dentalen Gewebe befinden.

Klinisch geht man auch davon aus, dass die gebildeten und sezernierten MMP's neben einer degradierenden Rolle auch eine wichtige Funktion bei physiologischen Entwicklungsmechanismen, wie z.B. der Bildung der Zahnhartsubstanzen spielen (*Brew et al., 2000; Manello et al., 2006; Nagase et al., 2006; Hannas et al., 2007*). Weiterhin vermutet man auch, dass einige MMP's, wie z.B. MMP-3, wahrscheinlich an physiologischen und pathologischen Vorgängen im Dentin-Pulpa-Komplex beteiligt sind (*Mazzoni et al., 2011*).

Kollagenasen wie MMP-1 und MMP-8 und Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 konnten unter anderem bei Entzündungen im apikalen Bereich nachgewiesen werden, wobei es aber momentan noch keine endgültigen Hinweise auf ihre Rolle im pulpalen Gewebe zu geben scheint (*Wahlgren et al., 2002*).

Auswertungen von *Wahlgren et al., (2002)* zeigen außerdem, dass z.B. die MMP-8 Konzentration, während einer Wurzelkanalbehandlung abnimmt. Demzufolge könnte die MMP-8 Konzentration, als ein Marker für die periapikale Entzündung oder die Qualität der Wurzelkanalaufbereitung sein.

Vieles deutet auch darauf hin, dass MMP's, wie z.B. MMP-2 (*Corotti et al., 2009*) und MMP-9 eine sehr kritische Rolle bei der Ausbildung einer Parodontitis spielen (*Smith et al., 2004; Corotti et al., 2009; de Paula-Silva et al., 2009; Dezerega et al., 2012*). Beide MMP's waren in der akuten Phase der Parodontitis verstärkt nachweisbar und zeigten in der chronischen Phase eine Abnahme ihrer Aktivität (*Corotti et al., 2009*).

Schon mehrfach erwähnt wurde die Vermutung, dass MMP's, insbesondere die Gelatinasen, in die organische Matrix des Dentins eingebaut sind und durch die Mineralisierung des Dentins geschützt werden (*Sulkala et al., 2007*).

Somit kann hierdurch wieder an die EnzChek®-Enzymtestung angeknüpft werden, mit welcher ebenfalls auch die Wurzel-Dentin-Scheiben dieser Kontrollgruppe untersucht wurden.

Es konnte auch in dieser Untersuchungsgruppe mit Hilfe der EnzChek®-Enzymtestung ein dementsprechender Nachweis einer unspezifischen gelatinolytischen und kollagenolytischen Aktivität innerhalb des Wurzeldentins erbracht werden.

5.2.3.1 Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 2

Messtechnisch ergaben sich in der Verteilung der enzymatischen Aktivitäten und ihrer Werte die gleichen Anhaltspunkte über eine spezifische Lokalisation der MMP's innerhalb des Wurzel-Dentins, wie in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne. Zu finden war eine

Zunahme der enzymatischen Aktivität von den koronalen Anteilen zu den apikalen Anteilen einer Zahn-Wurzel. Im Ergebnis dessen, wurden in allen Schnittebenen (*koronal, medial und apikal*) einer Probe, MMP's in unterschiedlicher Konzentration, gekennzeichnet durch eine unterschiedliche Aktivität, nachgewiesen. Dagegen ist jedoch innerhalb der einzelnen Schnittebene festzustellen, dass mit zunehmender Mess-Zeit bis $t = 120$ min nach Inkubation, ebenfalls wie in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne, ein Abklingen der enzymatischen Aktivität festzustellen ist. Diese Tatsache scheint ein Anzeichen dafür zu sein, dass die aktivierten und freigesetzten MMP's zum Großteil entweder wieder inaktiviert oder das zugegebene Substrat verbraucht wurde. Zumindest ist es ein Anzeichen dafür, dass die katalysierte Reaktion der Spaltung des zugegebenen Substrates mit relativ gleichmäßiger Geschwindigkeit abläuft.

So konnte im Mittel für die koronale Schnittebene eine enzymatische Aktivität von $8,86 \mu U$ pro mg Dentin, für die mediale im Mittel eine Aktivität von $9,86 \mu U$ pro mg Dentin und für die apikale Schnittebene im Mittel eine enzymatische Aktivität von $10,68 \mu U$ pro mg Dentin aus den vorhandenen Daten errechnet werden.

Mit Hilfe der statistischen Varianzanalyse durch den *gepaarten T-Test* konnten jeweils zwischen der koronalen und der medialen mit ($p = 0,0016$) und zwischen der koronalen und der apikalen Schnittebene mit ($p = 0,0002$) zu den Mess-Zeitpunkten $t = 0$ min bis $t = 120$ min jeweils statistisch signifikante Unterschiede in der enzymatischen Aktivität festgestellt werden. Lediglich zwischen der medialen und apikalen Schnittebene mit ($p = 0,0689$ bis $p = 0,0697$) waren keine eindeutigen statistisch signifikante Zusammenhänge nachweisbar. Die Werte lagen knapp oberhalb des definierten statistischen Signifikanzniveaus. Auffällig ist jedoch wieder die Höhe, also das entsprechende Niveau der enzymatischen Aktivitätswerte der einzelnen Proben. So finden wir im Gegensatz zur Gruppe der endodontisch behandelten Zähne hier in den einzelnen Schnittebenen teils deutlich höhere, aber auch deutlich verminderte enzymatische Aktivitätswerte, was für eine sehr hohe Individualität der MMP-Konzentration der Einzelzähne spricht. Es kann in dieser Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne durchaus in den Einzelwerten plausibel sein, höhere enzymatische Aktivitätswerte in den koronalen und apikalen Schnittebenenpräparate zu finden, da koronal im Gesamtzahn eine Auseinandersetzung mit den Bakterien der Mundhöhle stattfindet und auch apikal beim lebenden Zahn Umbauprozesse vor sich gehen. Vermutungen, einer von koronal nach apikal abfallenden enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins nicht endodontisch behandelter Zähne, haben sich nicht bestätigt.

5.2.4 Diskussion: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne)

In dieser Untersuchungsreihe wurden ausschließlich Dentin-Scheiben von Zähnen getestet,

die noch keine Exposition in der Mundhöhle hatten, d.h. die komplett von Schleimhaut und oder Kieferknochen umgeben waren und somit keinem Kontakt mit der Mundhöhlenflora ausgesetzt waren. Getestet wurde wiederum der Wurzel-Dentin-Komplex auf eine unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität, die durch das Vorhandensein von MMP's hervorgerufen wird. Entsprechend der Zielsetzung und Thematik dieser Arbeit, diente diese Untersuchungsgruppe ebenfalls als Kontrollgruppe. Auffällig an den Ergebnissen der Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne war, dass die gemessenen Fluoreszenzänderungen im Gegensatz zu denen der anderen Gruppen erhöht waren, wobei die Gewichtswerte der einzelnen Dentinscheiben etwas geringer als die der anderen Untersuchungsgruppen waren. Die aus dem Gewicht der einzelnen Dentinscheiben und der enzymatischen Aktivität pro Dentin-Scheibe errechnete relative enzymatische Aktivität von $10,06 \mu U$ pro mg Dentin, errechnet aus allen Mess-Werten und Mess-Zeiten aller Proben einer Untersuchungsgruppe, belegen diese Tatsache. Demgegenüber betrugen die Mittelwerte der relativen enzymatischen Aktivitätswerte in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne $10,05 \mu U$ pro mg Dentin und in der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne $9,73 \mu U$ pro mg Dentin.

Geht man von den wissenschaftlichen Thesen in der Literatur aus, hätte man eigentlich ein etwas anders Ergebnis erwarten müssen. Zähne in der Entwicklung hätten eigentlich ein höheres Potential an enzymatischer Aktivität vermuten lassen. Durch immunhistochemische Methoden konnte vor einiger Zeit ein Anhalt dafür gefunden werden, dass vermutlich einige MMP's offensichtlich im Prädentin an der Schmelz-Dentin-Grenze in Verbindung mit den Odontoblastenfortsätzen und der Kollagenmatrix konzentriert sind (*Boushell et al., 2008*). Weiterhin vermutet man lagebedingt, dass MMP's wahrscheinlich an physiologischen und pathologischen Vorgängen im Dentin-Pulpa-Komplex beteiligt sind (*Mazzoni et al., 2011*). All diese Erkenntnisse aus der Literatur ließen eigentlich eine Höhere enzymatische MMP-Aktivität erwarten. Da die Zähne eigentlich noch keinen Kontakt mit der Mundhöhlenfloren gehabt haben, ist eine Einflussnahme durch Prozesse, wie De- und Remineralisierung, parodontale Prozesse und konservierende adhäsive Zahnheilkunde ausgeschlossen. Auffällig an den Zähnen war im Gegensatz zur Wurzellänge ein sehr großes Pulpenlumen. Um dieses zu reinigen musste bei der labortechnischen endodontischen Behandlung während der Aufbereitung der Proben mehr Dentinabrieb in Kauf genommen werden, als bei den anderen Gruppen. Da es nicht ausgeschlossen ist, dass das Wachstum der Zähne die als Proben dienten noch nicht ganz abgeschlossen war, könnten durch die Aufbereitung durchaus Schichten von Dentin entfernt worden sein, die eine enzymatische Aktivität von MMP's enthalten haben. Trotzdem konnte auch in dieser Untersuchungsgruppe mit Hilfe der EnzChek®-Enzymtestung ein dementsprechender Nachweis erbracht werden,

dass innerhalb des Wurzel-Dentins eine unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität vorhanden ist.

5.2.4.1 Schnittebenenvergleich (koronal, medial, apikal) UG 3

Ebenso wie bei den anderen Testgruppen ergaben sich auch hier, in der Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne, die gleichen Anhaltspunkte für eine Verteilung der enzymatischen Aktivität bzw. für eine spezifische Lokalisation der MMP's innerhalb des Wurzel-Dentins von koronal nach apikal. Demzufolge ergeben sich für die Diskussion über die Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität die gleichen Anhaltspunkte, wie schon unter Punkt (5.2.2.1) diskutiert.

Im Vergleich der einzelnen Schnittebenen einer Zahn-Wurzel dieser Gruppe und aller Mess-Zeitpunkte zeigte sich die höchste enzymatische Aktivität mit einem Mittelwert von $12,65 \mu U$ pro mg Dentin jeweils in der apikalen Schnittebene. Ansonsten wurden im Mittel mit $7,99 \mu U$ pro mg Dentin in der koronalen Schnittebenen die geringsten enzymatischen Aktivitäten gemessen. Für die mediale Schnittebene konnte ein Wert von $9,52 \mu U$ pro mg Dentin ermittelt werden.

Im Ergebnis dessen, wurden zwischen den enzymatischen Aktivitätswerten der einzelnen Schnittebenen der Gruppe zu allen Mess-Zeiten signifikante Unterschiede festgestellt. Dabei lagen die entsprechenden p-Werte des definierten Signifikanzniveaus, getestet mit dem *gepaarten T-Test*, zwischen der koronalen und medialen Schnittebene bei ($p = 0,0013$), der koronalen und der apikalen Schnittebene bei ($p = 0,0001$) und der medialen und der apikalen Schnittebene bei ($p = 0,0001$). Vergleicht man die enzymatischen Aktivitätswerte der koronalen Schnittebene dieser Gruppe im Mittel von $7,99 \mu U$ pro mg Dentin mit der apikalen Schnittebene von $12,65 \mu U$ pro mg Dentin, so wird der Aktivitätsunterschied innerhalb der Zahnwurzel deutlich. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei noch nicht vollständig abgeschlossenem Wurzelwachstum oder bei Zähnen vor dem Durchbruch, eine höhere enzymatische Aktivität durch MMP's im Bereich der Wurzelspitze zu verzeichnen sein könnte. Die jeweiligen Aktivitätsunterschiede lassen sich bei den Einzelproben zu allen Mess-Zeiten feststellen.

5.2.5 Diskussion: Vergleich der einzelnen Gruppen (UG 1, UG 2, UG 3)

In den vorangegangenen Ausführungen zu den einzelnen Untersuchungsgruppen und den jeweiligen entsprechenden Schnittebenen, wurde ausgeführt, dass in allen untersuchten Proben eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Innerhalb einer jeden Gruppe konnte ein Anstieg der enzymatischen Aktivität von den koronalen zu den apikalen

Anteilen des Wurzel-Dentins festgestellt werden. Fasst man alle drei Schnittebenen einer Untersuchungsgruppe zusammen, so erhält man einen Mittelwert der für die enzymatische Aktivität im gesamten Wurzel-Dentin der entsprechenden Gruppe steht. So konnte für die Gruppe der endodontisch behandelten Zähne ein Mittelwert für die enzymatische Aktivität von $10,05 \mu U$ pro mg Dentin, für die Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne ein Wert von $9,73 \mu U$ pro mg Dentin und für die Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne ein Wert von $10,06 \mu U$ pro mg Dentin ermittelt werden. In Schussfolgerung dessen, kann man feststellen, dass die unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität in den Dentin-Scheiben der nicht endodontisch behandelten Zähne rein wertemäßig, geringfügig niedriger ist, als in der Gruppe der endodontisch behandelten und noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne. Da in der Literatur dazu keine vergleichbaren Studien gefunden wurden, kann über die Werthaltigkeit dieses Ergebnisses keine Aussage getätigt werden. Kleine Unterschiede sind zwar wertemäßig vorhanden, lassen sich aber statistisch nicht nachweisen. Statistisch gesehen ergibt sich zu keinem der entsprechenden Mess-Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. So betrugen die zwischen den Werten der endodontisch behandelten (UG 1) und nicht endodontisch behandelten Zähnen (UG 2) ermittelten Signifikanzwerte $p = 0,5084$ bis $p = 0,5290$, die zwischen den endodontisch behandelten (UG 1) und noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen (UG 3) $p = 0,9623$ bis $p = 0,9905$ und die zwischen den nicht endodontisch behandelten (UG 2) und noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähnen (UG 3) $p = 0,5144$ bis $p = 0,5319$.

Betrachtet man sich die entsprechenden Einzelwerte so kann man eine sehr hohe Volatilität der enzymatischen Werte feststellen. Auch beim Gruppenvergleich der einzelnen Schnittebenen untereinander lassen sich keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Im Gruppenvergleich der *apikalen Schnittebenen* aller Gruppen findet sich so in der Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne im Mittel der höchste enzymatische Aktivitätswert mit $12,65 \mu U$ pro mg Dentin, im Gegensatz zu $11,32 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne und $10,68 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähnen. Im Vergleich der *koronalen Schnittebenen* aller Gruppen findet sich ein anderes Bild. Hier beträgt die enzymatische Aktivität in der Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne im Mittel $7,99 \mu U$ pro mg Dentin, im Gegensatz zu $9,06 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne und $8,65 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne. Ein wiederum anderes Bild findet sich auch beim Vergleich der *medialen Schnittebenen* aller Untersuchungsgruppen. Für die enzymatische Aktivität in der Gruppe der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne konnte ein Mittelwert von $9,52 \mu U$ pro mg Dentin, von $9,76 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der endodontisch behandelten Zähne und von $9,86 \mu U$ pro mg Dentin in der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne errechnet

werden. Im Schnittebenvergleich der jeweiligen Ebenen der unterschiedlichen Gruppen findet sich somit in Hinblick auf das Verteilungsmuster der MMP's, wie gegenüber beim Schnittebenvergleich innerhalb einer Gruppe, kein einheitliches Verteilungsmuster der enzymatischen Aktivität. Bei der statistischen Auswertung im Schnittebenvergleich der Gruppen untereinander konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge in Bezug auf die enzymatische Aktivität festgestellt werden. Aus den Werten können letztendlich in Bezug auf die enzymatische Aktivität zwar innerhalb des Wurzel-Dentins von koronal nach apikal statistisch signifikante Zusammenhänge gefunden werden, die sich aber nicht auf das Wurzel-Dentin in einem Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen übertragen lassen. Dies spricht für die hohe Individualität eines Zahnes.

Mit weiteren Untersuchungen, des gezielten Nachweises der entsprechenden MMP's, die die momentan unspezifische enzymatische Aktivität hervorgerufen haben, könnten dann eventuell auch Vermutungen angestellt werden, welche Faktoren oder klinische Relevanzen dieses Ergebnis beeinflusst oder hervorgerufen haben. Hilfreich wäre es auch bei diesem Diskussionsansatz die Lagebestimmung der MMP's innerhalb der einzelnen Dentin-Scheiben (*pulpennah oder pulpenfern*) zu kennen. Lagebedingt stellt sich damit dann die Frage: Werden die erhöhten MMP-Aktivitäten durch klinische Vorgänge innerhalb der Pulpa (*Prozedere der Wurzelbehandlung*), durch externe klinische Vorgänge (*Parodontitis, apikale oder periapikale Veränderungen*) oder einfach nur durch die im Dentin eingeschlossenen MMP's ausgelöst. Dazu müsste dann auch das Studiendesign entsprechend angepasst werden.

5.3 Schlussfolgerungen / Konklusionen

Die nachfolgenden Fragestellungen, die in der Einleitung aufgeworfen wurden, lassen sich durch die erzielten Ergebnisse beantworten. Es ist aber davon auszugehen, dass die vorliegenden Daten und Ergebnisse dieser Untersuchung lediglich als Einstieg in die Thematik: „Untersuchungen zum Nachweis kollagenolytischer und gelatinolytischer Aktivität und deren Verteilung im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne“ dienen können. Sie sind als Teil einer Grundlagenforschung zu sehen und sollen die Basis für weitere tiefergehende Untersuchungen bilden, wie z.B. unter Punkt „Was bleibt zu tun?“ beschrieben.

Schlussfolgerung Fragestellung 1:

Die Fragestellung bezog sich auf die Aussage, ob sich im Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne eine enzymatische Aktivität durch MMP's nachweisen lässt. Aus den Ausführungen und Ergebnissen der hier dargestellten Untersuchung lässt sich eindeutig feststellen, dass es mit Hilfe des kommerziell erhältlichen EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* möglich ist, am Wurzel-Dentin endodontisch behandelter Zähne eine unspezifische gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität nachzuweisen. Im Gegensatz zu

den Studien aus der Literatur, wo eine enzymatische Aktivität der MMP's ausschließlich nur am pulverisiertem Dentin beschrieben wird, konnte mit dieser Studie nachgewiesen werden, das ein Nachweis ebenfalls am Dentin-Hartmaterial möglich ist.

Schlussfolgerung Fragestellung 2:

Eine weitere Fragestellung bezog sich auf eventuell vorhandene Unterschiede zwischen einer unspezifischen gelatinolytischen und kollagenolytischen enzymatischen Aktivität im Wurzel-Dentin endodontisch und nicht endodontisch behandelter Zähne. Da in allen zu untersuchenden Dentin-Scheiben eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnten, war es möglich für die einzelnen Untersuchungsgruppen einen Mittelwert der enzymatischen Aktivität pro mg Dentin zu bestimmen. In den reinen Werten von $10,05 \mu U$ pro mg Dentin für die Gruppe der endodontisch behandelten Zähne, von $9,73 \mu U$ pro mg Dentin für die Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähnen und von $10,06 \mu U$ pro mg Dentin für die Gruppe der noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochenen Zähne, lassen sich zahlen- und wertemäßige Unterschiede finden, die allerdings statistisch signifikant nicht bestätigt werden konnten.

Schlussfolgerung Fragestellung 3:

Mit einer weiteren Fragestellung sollte geprüft werden, ob sich Unterschiede in der Verteilung der MMP's und deren Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins von koronal nach apikal nachweisen lassen. Diese Frage kann aus den vorliegenden Ergebnissen eindeutig bejaht werden. In allen Untersuchungsgruppen ließen sich enzymatische Aktivitäten in den einzelnen Schnittebenen nachweisen. Es konnten enzymatische Aktivitätshöhepunkte jeweils zum Zeitpunkt nach erfolgter zweistündiger Inkubation aufgezeigt werden. Generell deuten die Ergebnisse in allen Untersuchungsgruppen darauf hin, dass es einen Unterschied in der Verteilung der enzymatischen Aktivität innerhalb des Wurzel-Dentins von koronal nach apikal gibt, wobei die Aktivitätswerte von den koronalen zu den apikalen Anteilen einer Zahn-Wurzel hin ansteigen. Diese Zusammenhänge konnten statistisch signifikant belegt werden.

Schlussfolgerung Fragestellung 4:

In die Beantwortung dieser Fragestellung fließt der Vergleich der einzelnen jeweiligen Schnittebenen pro Untersuchungsgruppe ein. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Ebenen, so lassen sich beim Vergleich der einzelnen Schnittebenen der einzelnen Gruppen lediglich zwischen der apikalen Schnittebene der Gruppe der nicht endodontisch behandelten Zähne gegenüber der apikalen Schnittebene der noch nicht in der Mundhöhle exponierten Zähne statistisch signifikante Unterschiede feststellen.

Schlussfolgerung Fragestellung 5:

Fragestellung 5 dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Lagerungsmedien auf die zu lagernden Zähne und Zahnbestandteile bzw. auf die zu untersuchende enzymatische Aktivität. Als Lagerungsmedium wurden normales Leitungswasser (H₂O), 70%ige Ethanollösung, 0,1%ige und 1%ige Thymollösung verwendet. Als weiteres Lagerungsmedium wurde eine Tiefkühlung der entsprechenden Präparate bei -28°C getestet. Die Ergebnisse der Versuche einer Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch entsprechende Lagerungsmedien haben jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge erbracht. Aus den erzielten Einzelergebnissen lässt sich als Trend für die Lagerung von Zähnen und Zahnbestandteilen jedoch generieren, dass 0,1%ige Thymollösung nicht ungünstig ist. Alternativ könnten auch eine Tiefkühlung der Präparate bei -28°C und eine Lagerung in 70%iger Ethanollösung in Erwägung gezogen werden.

Was bleibt zu tun?

Aus den Ergebnissen der dargestellten Versuche resultiert die Fragestellung nach der Aufschlüsselung und Klassifizierung der unspezifisch nachgewiesenen MMP's in spezielle Vertreter. Diese konnte mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht beantwortet werden, da die Testmethode EnzChek® *Gelatinase / Collagenase Assay Kit E12055* dafür nicht geeignet war. Weitergehende Versuche, die eine Aufschlüsselung der MMP's in spezielle Vertreter ermöglichen würden, könnten mit der Methode der *Zymographie* oder der *Western-Blot-Methode* durchgeführt werden.

In weiterführenden Untersuchungsschritten könnte dann ebenfalls auch festgestellt werden, ob die nachgewiesene unspezifische enzymatische Aktivität eine Veränderung an der dreidimensionalen Kollagenstruktur des Dentins endodontisch behandelter Zähne bewirkt haben könnte. Dies würde man mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen bewerkstelligen.

Des Weiteren könnte die nachgewiesene unspezifische enzymatische Aktivität durch geeignete Testverfahren näher aufgeschlüsselt werden. Untersucht werden könnte auch eine Verteilung der MMP's innerhalb der einzelnen Wurzel-Dentin-Scheiben vom Wurzelkanallumen zur Dentin-Wurzelzement-Grenze. Für die letzteren Untersuchungen müsste aber das Studiendesign angepasst oder teilweise geändert werden. Vorstellbar hierfür wären immunhistologische Untersuchungen.

Die Fragestellung, ob das klinische Alter der endodontischen Wurzelfüllung des Zahnes oder das Alter des Patienten einen Einfluss auf das Vorhandensein oder die Höhe einer entsprechenden MMP-Aktivität haben, sollte noch näher in den Fokus der Untersuchungen gelangen. Demzufolge sollten für weitere Untersuchungen idealerweise Zahnpaare von

denselben Probanden zur Verfügung stehen. Die Zahnpaare sollten jeweils aus einem endodontisch und einem nicht endodontisch behandelten Zahn bestehen. Zudem sollte das Alter des Patienten und der Wurzelfüllung bekannt sein, um diese variablen Einflussgrößen statistisch mit auswerten zu können.

6 Literatur

1. Alai-Omid M (2008)
Experimentelle Untersuchung zum Nachweis und zur Modifikation der enzymatischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen im Dentin.
Med. Diss., Homburg/Saar
2. Alexander SA, Swerdloff M. (1980)
Collagenolytic activity of periodontal ligament and hydroxyproline content during human deciduous root resorption.
J Periodontal Res. 15: 434-43
3. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA (2007)
Biology of metalloproteinases.
Rom J Morphol Embryol 48: 323-34
4. Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA (2010)
Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions.
Rom J Morphol Embryol 51: 215-28
5. Andonovska B, Dimova C, Panov S (2008)
Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in chronic periapical lesions.
Vojnosanit Pregl 65: 882-6
6. Beer R (2010)
Langzeitprobleme adhäsiver Verankerungen im Wurzelkanal.
ZWP 16: 3
7. Beer R, Espig A, Espig C (2011)
State of the Art: Wurzelkanäle adhäsiv und dauerhaft füllen.
Endodontie Journal 10: 6-10
8. Belmar MJ, Pabst C, Martínez B, Hernández M (2008)
Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 105: 801-6
9. Birkedal-Hansen H (1993)
Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases.
J Periodontol. 64: 474-84
10. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993)
Matrix metalloproteinases: a review.
Crit Rev Oral Biol Med 4: 197-250
11. Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, Pollard AH, Lyons G, Stetler-Stevenson W, Birkedal-Hansen B (2008)
Matrix metalloproteinases.
Curr Protoc Cell Biol Chapter 10: Unit 10.8.
12. Bode W (2003)
Structural basis of matrix metalloproteinase function.
Biochem Soc Symp. 70: 1-14
13. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K (1999)
Structural properties of matrix metalloproteinases.
Cell Mol Life Sci 55: 639-52

14. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010)
Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion.
Semin Cancer Biol. 20: 161-8.
15. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M (2008)
Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin.
Arch Oral Biol 53: 109-16
16. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H (2000)
Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.
Biochim Biophys Acta 1477: 267-83
17. Buddecke E (1985)
Grundriss der Biochemie. (7.Auflage)
Walter de Gruyter, Berlin, New York
18. Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kücüküldirim S, Er N (2009)
The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 108: e121-6
19. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, Sogayar M, Granjeiro JM (2009)
Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107: 127-32
20. Chaussain C, Boukpepsi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S (2013)
Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration
Front Physiol 4: Article 308
21. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S (2006)
The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries.
J Dent Res 85: 22-32
22. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM (2009)
Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development.
Arch Oral Biol 54: 764-71
23. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B (2010)
Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives.
Eur J Oral Sci 118: 494-501.
24. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B (2009)
Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces.
J Dent Res 88: 1101-6
25. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B (2005)
A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results.
J Dent Res 84: 118-32
26. De Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL (2009)
High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas.
J Endod 35: 1234-42

27. DeWald JP (1997)
The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations.
Dent Mater 13: 74-81
28. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, García-Sesnich J, Ortega AV, Gamonal J, Hernández M (2012)
Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response.
J Inflamm (Lond) 9: 8
29. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK (1995)
Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin.
Caries Res. 29: 483-9
30. Ehlers V, Kasaj A, Prescher N, Willershausen B (2008)
MMP-8-Messung bei Patienten mit chronischer Parodontitis und Schwangerschafts-gingivitis
DZZ 63: 206-8
31. Ferrari M, Mason PN, Goracci C, Pashley DH and Tay FR (2004)
Collagen Degradation in Endodontically Treated Teeth after Clinical Function.
J Dent Res 83: 414
32. Fingleton B, Lynch CC (2010)
A new dress code for MMPs: cleavage optional.
Dev Cell. 18: 3-4.
33. Flannery CR (2006)
MMPs and ADAMTSs: functional studies.
Front Biosci. 11: 544-69
34. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS (2004)
Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease.
J Clin Periodontol 31: 671-9
35. Goodis HE, Marshall GW, JR., Withe JM (1991)
The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro.
Arch Oral Biol 36: 561-566.
36. Goodis HE, Marshall GW, JR., Withe JM, Gee L, Hornberger B, Marshall SJ (1993)
Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths.
Dent Mater 9: 79-84
37. Gross J, Lapiere CM (1962)
Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.
Proc Natl Acad Sci USA 48: 1014-22
38. Haller B, Hofmann N, Klaiber B, Bloching U (1993)
Effect of storage media on microleakage of five dentin bonding agents.
Dent Mater 9: 191-197
39. Hamacher S, Matern S, Roeb E (2004)
Extracellular matrix - from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases.
Dtsch Med Wochenschr 129: 1976-80

40. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L (2007)
The role of matrix metalloproteinases in the oral environment.
Acta Odontol Scand 65: 1-13
41. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H (2003)
SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 66: 287-98.
42. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR (2005)
Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo.
J Dent Res 84: 741-6
43. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2006)
Einführung in die Zahnerhaltung. (4. Auflage)
Urban & Fischer Verlag, München, Jena
44. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J (2006)
Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity.
J Periodontol. 77: 1863-70
45. Hernández Ríos M, Sorsa T, Obregón F, Tervahartiala T, Valenzuela MA, Pozo P, Dutzan N, Lesaffre E, Molas M, Gamonal J (2009)
Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade.
J Clin Periodontol 36: 1011-7
46. Hijova E (2005)
Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications
Bratisl Lek Listy 106: 127-32
47. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T (1996)
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients.
J Clin Periodontol. 23: 1127-32
48. Jameson MW, Tidmarsh BG, Hood JA (1994)
Effect of storage media on subsequent water loss and regain by human and bovine dentine and on mechanical properties of human dentine in vitro.
Arch Oral Biol. 39: 759-67
49. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA (2011)
Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine.
Caries Res 45: 429-34
50. Kaul R, Kaul V, Farooq R, Wazir ND, Khateeb SU, Malik AH, Masoodi AA (2014)
Cut off values of laser fluorescence for different storage methods at different time intervals in comparison to frozen condition: A 1 year in vitro study
J Conserv Dent 17:124-128
51. Kawasaki K, Featherstone JD (1997)
Effects of collagenase on root demineralization.
Dent Res. 76: 588-95
52. Koolmann J, Röhm KH (1994)
Taschenatlas der Biochemie.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York

53. Kramer E, Robra BP, Walther W, Heners M (2008)
Vertikale Wurzelfrakturen an endodontisch behandelten Zähnen.
DZZ 63: 330-6
54. Lapp CA, Lohse JE, Lewis JB, Dickinson DP, Billman M, Hanes PJ, Lapp DF (2003)
The effects of progesterone on matrix metalloproteinases in cultured human gingival fibroblasts.
J Periodontol 74: 277-88
55. Linde A, Goldberg M (1993)
Dentinogenesis.
Crit Rev Oral Biol Med 4: 679-728
56. Lynch CC, Matrisian LM (2002)
Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication.
Differentiation 70: 561-73
57. Malesmud CJ (2006)
Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.
Front Biosci 11: 1696-701
58. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S (2006)
Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells.
Stem Cells 24: 475-81
59. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000)
The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine.
Arch Oral Biol 45: 757-65
60. Maskos K (2005)
Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors.
Biochimie 87: 249-63
61. Matsumoto H, Kitamura S, Araki T (2001)
Applications of fluorescence microscopy to studies of dental hard tissue.
Front Med Biol Eng. 10: 269-84
62. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L (2007)
Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin.
J Dent Res 86: 436-40
63. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Breschi L (2009)
Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis.
J Biomed Mater Res A 88: 697-703
64. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Gobbi P, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L (2011)
Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine.
ABC J Dent 39: 231-7
65. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L (2013)
Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9
J Dent Res 92: 82-6

-
66. McDonnell G, Russel AD (1999)
Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance.
Clin Microbiol Rev 12: 147-179
67. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR (2012)
Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response.
J Endod 38: 604-7
68. Micheletti Cremasco M. (1998)
Dental histology: study of aging processes in root dentine.
Boll Soc Ital Biol Sper. 74: 19-28
69. Moura JS, Rodrigues LK, Del Bel Cury AA, Lima EM, Garcia RM (2004)
Influence of storage solution on enamel demineralization submitted to pH cycling.
J Appl Oral Sci. 12: 205-8
70. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006)
Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.
Cardiovasc Res 69: 562-73
71. Nagase H, Woessner JF Jr (1999)
Matrix metalloproteinases.
J Biol Chem 274: 21491-4
72. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH (2006)
Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives.
Eur J Oral Sci 114: 160-6
73. Nordbø H, Leirskar J, Ngo H, Mount GJ, Wahlgren J. (2003)
The influence of a matrix metalloproteinase on the remineralization of artificially demineralized dentin.
Oral Health Prev Dent. 1: 267-72
74. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M (2011a)
Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation.
Eur J Oral Sci 119: 79-85
75. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, Toledano M (2011b)
Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants.
J Dent 39: 148-53
76. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003)
Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue.
Eur J Oral Sci 111: 117-27
77. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S (2004)
Collagen degradation by host-derived enzymes during aging.
J Dent Res 83: 216-21
78. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL (2010)
Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment.
J Endod. 36: 231-7

79. Retief DH, Wendt S, Bradley EL, Denys FR (1989)
The effect of storage media and duration of storage of extracted teeth on the shear bond strength of Scotchbond 2/Silux to dentin.
Am J Dent; 2: 269-273
80. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM (1996)
Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment.
Curr Opin Periodontol. 3: 85-96
81. Santana FR, Pereira JC, Pereira CA, Fernandes Neto AJ, Soares CJ (2008)
Influence of method and period of storage on the microtensile bond strength of indirect composite resin restorations to dentine.
Braz Oral Res. 22: 352-357
82. Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane L. (2009)
Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin.
J Endod. 35: 686-9
83. Satoyoshi M, Kawata A, Koizumi T, Inoue K, Itohara S, Teranaka T, Mikuni-Takagaki Y (2001)
Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization.
J Endod. 27: 462-6
84. Schmeer SE (2013)
Experimentelle Untersuchung zu y-strahleninduzierten strukturellen Veränderungen des Dentins.
Med. Diss., Homburg/Saar
85. Shimada Y, Kondo Y, Inokoshi S, Tagami J, Antonucci JM (1999)
Demineralizing effect of dental cements on human dentin.
Quintessence Int 30: 267-73
86. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS (2002)
Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions.
ABC J Endod. 28: 313-5
87. Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, Bae KS (2011)
Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 112: 548-54
88. Smith GN Jr (2006)
The role of collagenolytic matrix metalloproteinases in the loss of articular cartilage in osteoarthritis.
Front Biosci. 11: 3081-95
89. Smith PC, Muñoz VC, Collados L, Oyarzún AD (2004)
In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease.
J Periodontal Res. 39: 87-92
90. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005)
Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Biotechniques 38: 73-83
91. Solovykh EA, Karaoglanova TB, Kushlinskii NE, Yanushevich OO (2013)
Matrix metalloproteinases and inflammatory cytokines in the oral fluid of patients with chronic generalized periodontitis various structural materials restoration of teeth and dentition.
Klin Lab Diagn. 10: 55-8, 18-21

-
92. Sorsa T, Mäntylä P, Rönkä H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, Kinane DF, Salo T, Golub LM, Teronen O, Tikanoja S (1999)
Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease.
Ann N Y Acad Sci 878: 130-40
93. Sorsa T, Tervahartiala T, Leppilähti J, Hernandez M, Gamonal J, Tuomainen AM, Lauhio A, Pussinen PJ, Mäntylä P (2011)
Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines.
Pharmacol Res 63: 108-13
94. Sorsa T, Tjäderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P (2006)
Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation.
Ann Med 38: 306-21
95. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T (2004)
Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases.
Oral Dis 10: 311-8
96. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990)
Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation.
Proc Natl Acad Sci U S A 87: 364-8
97. Sternlicht MD, Werb Z. (2001)
How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.
Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516
98. Strawn SE, White JM, Marshall GW, Gee L, Goodis HE, Marshall SJ (1996)
Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions-short term.
J Dent; 24: 417-423
99. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L (2002)
The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth
J Dent Res 81: 603-7
100. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L (2007)
Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin.
Arch Oral Biol 52: 121-7
101. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R (2006)
Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin.
J Endod. 32: 862-8
102. Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M (2008)
Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration.
Int Endod J. 41: 1115-22.
103. Titley KC, Chernenky R, Rossouw PE, Kulkarni GV (1998)
The effect of various storage methods and media on shear-bond strength of dental composite resin to bovine dentine.
Arch Oral Biol; 43: 305-311

-
104. Tjäderhane L (2009)
The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in root fracture resistance remains unknown.
Dent Traumatol 25: 142-3
105. Tjäderhane L, Buzalaf MA, Salo T (2014)
The origin of matrix metalloproteinases in attrited dentine.
Arch Oral Biol 59: 233-5
106. Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T (2007)
The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis
Int Endod J 40: 282-9
107. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T (1998)
The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions.
J Dent Res 77: 1622-9
108. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, Alaminos M (2010)
Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine.
J Dent 38: 635-40
109. Tosun G, Sener Y, Sengun A (2007)
Effect of storage duration/solution on microshear bond strength of compo-site to enamel.
Dent Mater J 26: 116-121
110. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G (2003)
Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges.
Oper Dent 28: 215-35
111. Van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V (2003)
Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ.
Caries Res 37: 58-65
112. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990)
The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.
Proc Natl Acad Sci U S A 87: 5578-82
113. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG (1983a)
The amount and distribution of sclerotic human root dentine.
Arch Oral Biol. 28: 645-9
114. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG (1983b)
The histology of sclerotic human root dentine.
Arch Oral Biol. 28: 693-700
115. Verma RP, Hansch C (2007)
Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs
Bioorg Med Chem 15: 2223-68
116. Verstappen J, Von den Hoff JW (2006)
Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease
J Dent Res 85: 1074-84

-
117. Visse R, Nagase H (2003)
Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.
Circ Res 92: 827-39
118. Vu TH, Werb Z. (2000)
Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.
Genes Dev 14: 2123-33
119. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L (2002)
Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates.
Int Endod J 35: 897-904
120. Wang DY, Zhang L, Fan J, Li F, Ma KQ, Wang P, Chen JH (2012)
Matrix metalloproteinases in human sclerotic dentine of attrited molars.
Arch Oral Biol 57: 1307-12.
121. Watanabe I, Nakabayashi N (1994)
Measurement methods for adhesion to dentine: the current status in Japan.
J Dent; 22: 67-72
122. Woessner JF Jr (1991)
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.
FASEB J 5: 2145-54
123. Woessner JF Jr (2002)
MMPs and TIMPs - an historical perspective.
Mol Biotechnol. 22: 33-49
124. Yokota H, Goldring MB, Sun HB (2003)
CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear.
J Biol Chem. 278: 47275-80
125. Zhang SC, Kern M (2009)
The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives.
Int J Oral Sci 1: 163-76
126. Ziskind D, Gleitman J, Rotstein I, Friedman M (2003)
Evaluation of cetylpyridinium chloride for infection control in storage solution.
J Oral Rehabil. 30: 477-81

7 Publikationen / Danksagung

7.1 Publikationen

Ergebnisse dieser Untersuchung wurden auf der 30. Karlsruher Konferenz der Akademie für Zahnärztliche Fortbildung am 20. März 2015 in Karlsruhe im Rahmen eines Fachvortrages präsentiert.

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für die hervorragende, ausgezeichnete Betreuung und stetige konstruktive Kritik, sowohl in den praktischen Versuchsdurchführungen als auch bei der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Stefan Rupf gilt ebenfalls mein besonderer Dank für die hervorragende, ausgezeichnete Betreuung bei der praktischen und wissenschaftlichen Durchführung, insbesondere auch bei der statistischen Auswertung und der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit, sowie für die ständige Motivation.

Frau Dr. rer. nat. Natalia Umanskaja gilt mein Dank für die wissenschaftliche Betreuung bei den praktischen Versuchsplanungen und Durchführungen.

Nicht zuletzt möchte ich speziell meiner Mutter und meinem Praxisteam für die Geduld und stetige Unterstützung während der praktischen Durchführung und Erstellung der vorliegenden Dissertation Dank sagen.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung, <i>illustration</i>
C	Kohlenstoff, <i>carbon</i>
DEJ	Schmelz-Dentin-Grenze, <i>dentinoenamel junction</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>
GCF	Gingivale Sulcusflüssigkeit, <i>gingival crevicular fluid</i>
IHC	Immun-Histo-Chemische Methoden, <i>immunohistochemical methodologies</i>
kDa	Kilo-Dalton
MMP	Matrix Metalloproteinasen, <i>matrix metalloproteinaes</i>
N	Stickstoff, <i>nitrogen</i>
PISF	Gingivale Implantat-Sulkusflüssigkeit, <i>peri-implantat sulcus fluid</i>
PMN	Polymorphkernige Leukozyten, <i>polymorphonuclear leukocytes</i>
Tab	Tabelle, <i>table / chart</i>
TIMP	Gewebeinhibitor von MMPs, <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht der Klassifizierung der Makromoleküle der extrazellulären Matrix (ECM), Abbildung modifiziert nach <i>Hamacher et al., 2004</i>	6
Abbildung 2:	Grundsätzliche strukturelle Domänstruktur der MMP's, Abbildung modifiziert nach <i>Visse und Nagase, 2003 und Chaussain-Miller et al., 2006</i>	7
Abbildung 3:	Strukturelle Anordnung der unterschiedlichen Domänen der verschiedenen MMP's, Abbildung modifiziert nach <i>Hamacher et al., 2004</i>	7
Abbildung 4:	Aktivierungsmechanismus der MMP's über den so bezeichneten „Cystein-Switch“, Abbildung modifiziert nach <i>Springman et al., 1990</i>	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung und des Aufbaues des Dentins, Abbildung modifiziert nach <i>Hellwig et al., 2006</i>	15
Abbildung 6:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Dentintubuli im Wurzeldentin, Aufnahme aus dem Bildfundus der Universität des Saarlandes	16
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der generierten Schnittebenen von koronal nach apikal innerhalb einer Zahn-Wurzel zur Einzelprobengewinnung	27
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der einzelnen gewonnenen Dentin-Scheiben aus einer Zahnwurzel jeweils koronal, medial und apikal	28

- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmessung; das einfallende Licht der Wellenlänge λ wird durch die fluoreszierende Substanz in der Probe umgewandelt in das Licht der Wellenlänge λ_1 , die dann von einem Lichtdetektor gemessen werden kann _____ 31
- Abbildung 10: Darstellung der Versuchsplanung und Verfahrensweise der enzymatischen Aktivitätsmessung am Wurzel-Dentin-Hartmaterial _____ 32
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Gewinnung und Lagerung der Dentin-Scheiben für den Versuchsansatz 1 und 2 für die enzymatischen Aktivitätstestungen nach Lagerung im entsprechenden Medium _____ 33
- Abbildung 12: Schema der Pipettierung der Standard-Lösungen pro Untersuchungs-Well für die Fluoreszenzmessung _____ 37
- Abbildung 13: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 0$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau -ermittelte Trendlinie) _____ 41
- Abbildung 14: UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwert aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation _____ 43
- Abbildung 15: UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min _____ 44
- Abbildung 16: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwerte aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation _____ 47
- Abbildung 17: UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min _____ 48
- Abbildung 18: Zähne der Untersuchungsgruppe 3; (a) kompletter noch nicht aufbereiteter Zahn; (b und c) aufbereitete Zahn Wurzeln mit Blick in das Wurzelkanallumen _____ 49
- Abbildung 19: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung innerhalb der jeweiligen Einzelproben (Mittelwerte aller Schnittebenen) während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation _____ 51
- Abbildung 20: UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - Graphische Darstellung der relativen enzymatischen Aktivität der koronalen, medialen und apikalen Schnittebene in μU pro mg Dentin während des EnzChek®-Testes über einen Mess-Zeitraum von $t = 120$ min _____ 52

- Abbildung 21: Graphische Darstellung der Werte der relativen enzymatischen Aktivität (Mittelwerte aller Schnittebenen der Proben) in μU pro mg Dentin der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t=0$ min bis $t=120$ min _____ 53
- Abbildung 22: graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der jeweiligen koronalen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min _____ 54
- Abbildung 23: Graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der jeweiligen medialen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min _____ 55
- Abbildung 24: Graphische Darstellung der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der jeweiligen apikalen Schnittebenen der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) für die Mess-Zeitpunkte $t = 0$ min bis $t = 120$ min _____ 56
- Abbildung 25: Lagerungsmedien (gelagerte Dentin-Scheiben) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation _____ 59
- Abbildung 26: Lagerungsmedien (gelagerte komplette Zähne) - graphische Darstellung der enzymatischen Aktivitätsänderung während des EnzChek®-Testes über einen Zeitraum $t = 120$ min nach Inkubation _____ 60
- Abbildung 27: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte (aller Mess-Zeiten) der relativen enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der gelagerten Dentin-Scheiben in den entsprechenden Lagerungsmedien _____ 60
- Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Mittelwerte (aller Mess-Zeiten) der relativen enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der gelagerten kompletten Zähne in den entsprechenden Lagerungsmedien _____ 61
- Abbildung 29: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie) _____ 111
- Abbildung 30: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie) _____ 111

Abbildung 31: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$ (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie) _____ 111

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Differenzierte Domänenstruktur einzelner MMP's, Tabelle modifiziert nach Visse und Nagase, 2003 und Chaussain-Miller et al., 2006 _____	7
Tabelle 2:	Einteilung der Matrix Metalloproteinasen und ihre Substratspezifität, Tabelle modifiziert nach Lynch und Matrisian, 2002 _____	9
Tabelle 3:	Geräte, Instrumente und Lösungen die zur Auf- und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials der Vorversuche verwendet wurden _____	30
Tabelle 4:	Packungsinhalt des EnzChek® Gelatinase / Collagenase Assay Kit der Firma Molecular Probes® _____	35
Tabelle 5:	Pipettier- und Verdünnungsreihe der Standard-Lösungen S1 bis S17 und B0 für die Standard-Kurve _____	37
Tabelle 6:	Fluoreszenz-Mess-Werte der Standard-Lösungen S1 bis S17 und B0 in RUF für die Berechnung der enzymatischen Konzentrationswerte aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien für die Mess-Zeitpunkte $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$ _____	40
Tabelle 7:	Auflistung der Gewichtsangaben der Dentin-Scheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne), Angaben in mg _____	41
Tabelle 8:	Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ generiert wurden _____	42
Tabelle 9:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ _____	42
Tabelle 10:	UG 1 (endodontisch behandelte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$ _____	43
Tabelle 11:	Auflistung der Gewichtsangaben der Dentin-Scheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne), Angaben in mg _____	45
Tabelle 12:	Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ generiert wurden _____	46

Tabelle 13:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ _____	46
Tabelle 14:	UG 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$ _____	47
Tabelle 15:	Auflistung der Gewichtsangaben der Dentinscheiben und deren Mittelwerte der Untersuchungsgruppe 3 (Zähne ohne Exposition in der Mundhöhle), Angaben in mg _____	49
Tabelle 16:	Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Schnittebenen der UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ generiert wurden _____	50
Tabelle 17:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ _____	50
Tabelle 18:	UG 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) - Relative enzymatische Aktivität je Probe (Mittelwert aller Schnittebenen) in μU pro mg Dentin zu den unterschiedlichen Mess-Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$ _____	51
Tabelle 19:	Übersicht der enzymatischen Aktivität in μU pro mg Dentin der einzelnen Untersuchungsgruppen (UG 1 endodontisch behandelte Zähne, UG 2 nicht endodontisch behandelte Zähne, UG 3 noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne); dargestellt sind die errechneten Mittelwerte für die Mess-Zeitpunkte $t = 0 \text{ min}$ bis $t = 120 \text{ min}$ _____	53
Tabelle 20:	Auflistung der Gewichtsangaben der Dentinscheiben und deren Mittelwerte der Versuche mit den unterschiedlichen Lagerungsmedien, Angaben in mg _____	58
Tabelle 21:	Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Lagerungsmedien in RUF, die durch die EnzChek®-Messung zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ generiert wurden _____	59
Tabelle 22:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ _____	59
Tabelle 23:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30 \text{ min}$ _____	112
Tabelle 24:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60 \text{ min}$ _____	112

Tabelle 25:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$	112
Tabelle 26:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30 \text{ min}$	113
Tabelle 27:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60 \text{ min}$	113
Tabelle 28:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$	113
Tabelle 29:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30 \text{ min}$	114
Tabelle 30:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60 \text{ min}$	114
Tabelle 31:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$	114
Tabelle 32:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30 \text{ min}$	115
Tabelle 33:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60 \text{ min}$	115
Tabelle 34:	Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120 \text{ min}$	115

8.4 Anhänge: zusätzliche Tabellen und Graphiken

8.4.1 Anhang Gliederungspunkt 4.1.2

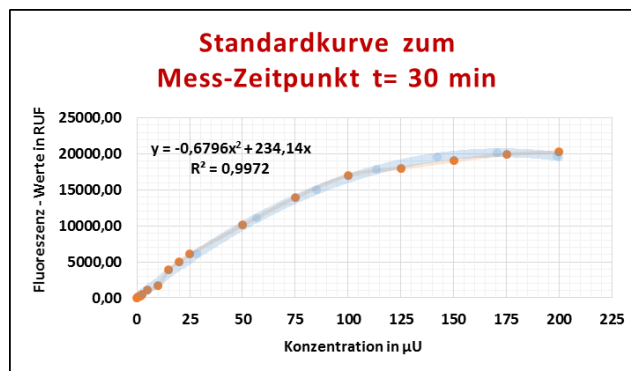


Abbildung 29: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie)

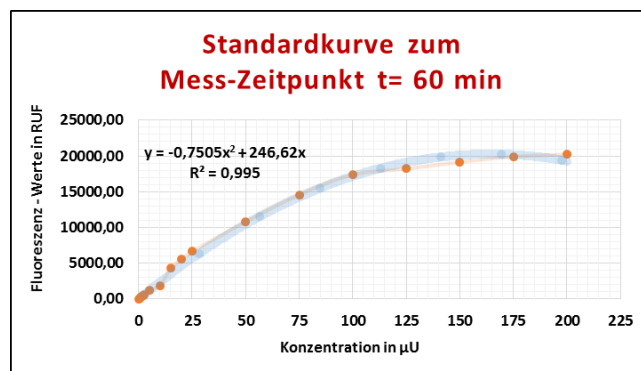


Abbildung 30: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie)

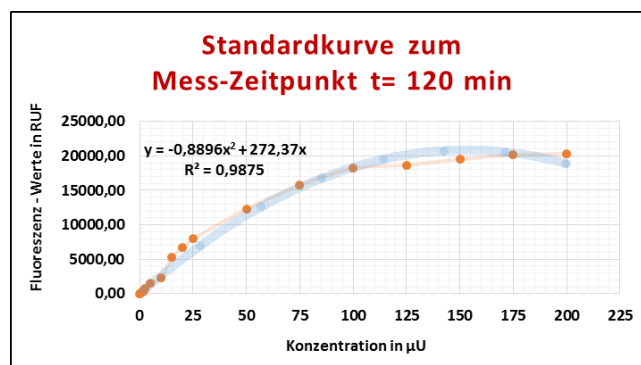


Abbildung 31: Standard-Kurve mit mathematischer Formel und Bestimmtheitsmaß R^2 zu Berechnung der enzymatischen Aktivitätswerte der Proben aller Untersuchungsgruppen (UG 1, UG 2, UG 3 und der Versuchsreihen mit den Lagerungsmedien) aus den entsprechend ermittelten Fluoreszenzwerten zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min (orange – xy-Wertepaare aus der Fluoreszenzmessung, blau - ermittelte Trendlinie)

8.4.2 Anhang Gliederungspunkt 4.2.2.

Tabelle 23: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	10,73	9,04	7,77	9,83	8,61	7,20	11,87	9,84	7,48	10,44	9,28
mediale Dentin-Scheibe	11,10	10,43	9,04	10,44	9,07	6,65	12,31	11,45	8,80	10,68	10,00
apikale Dentin-Scheibe	12,29	11,46	10,43	11,49	14,37	5,28	15,67	10,78	9,25	14,95	11,60
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	11,37	10,31	9,08	10,59	10,68	6,37	13,28	10,69	8,51	12,02	10,29

Tabelle 24: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	10,23	8,62	7,41	9,37	8,21	6,84	11,32	9,38	7,13	9,95	8,85
mediale Dentin-Scheibe	10,58	9,94	8,62	9,96	8,65	6,33	11,73	10,92	8,39	10,17	9,53
apikale Dentin-Scheibe	11,72	10,93	9,94	10,95	13,70	5,03	14,94	10,28	8,81	14,25	11,06
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	10,85	9,83	8,66	10,09	10,19	6,07	12,67	10,19	8,11	11,46	9,81

Tabelle 25: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 1 (endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min

UG1 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	9,52	8,02	6,89	8,72	7,64	6,31	10,54	8,73	6,64	9,26	8,23
mediale Dentin-Scheibe	9,85	9,25	8,02	9,27	8,05	5,84	10,92	10,15	7,79	9,41	8,86
apikale Dentin-Scheibe	10,91	10,17	9,25	10,20	12,75	4,67	13,91	9,57	8,17	13,24	10,28
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	10,10	9,15	8,06	9,40	9,48	5,60	11,79	9,48	7,53	10,64	9,12

8.4.3 Anhang Gliederungspunkt 4.3.2

Tabelle 26: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	8,41	8,01	8,59	7,00	7,98	10,76	10,12	10,77	8,18	8,80	8,86
mediale Dentin-Scheibe	9,08	9,85	9,83	9,55	10,76	10,77	11,11	11,49	9,05	9,55	10,10
apikale Dentin-Scheibe	10,14	10,77	10,43	10,13	8,81	11,12	12,29	11,89	11,47	12,30	10,94
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	9,21	9,54	9,62	8,89	9,19	10,88	11,17	11,38	9,57	10,22	9,97

Tabelle 27: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	8,02	7,64	8,19	6,67	7,61	10,26	9,65	10,27	7,80	8,39	8,45
mediale Dentin-Scheibe	8,66	9,39	9,38	9,10	10,26	10,27	10,59	10,96	8,63	9,11	9,63
apikale Dentin-Scheibe	9,67	10,27	9,95	9,66	8,40	10,60	11,72	11,34	10,94	11,73	10,43
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	8,78	9,10	9,17	8,48	8,76	10,38	10,65	10,86	9,12	9,74	9,50

Tabelle 28: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 2 (nicht endodontisch behandelte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min

UG2 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	7,46	7,11	7,62	6,20	7,08	9,55	8,97	9,56	7,26	7,81	7,86
mediale Dentin-Scheibe	8,06	8,74	8,73	8,47	9,55	9,56	9,86	10,20	8,03	8,48	8,97
apikale Dentin-Scheibe	9,00	9,55	9,26	8,99	7,81	9,87	10,91	10,55	10,18	10,91	9,70
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	8,17	8,47	8,54	7,89	8,15	9,66	9,91	10,10	8,49	9,07	8,84

8.4.4 Anhang Gliederungspunkt 4.4.2.

Tabelle 29: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	10,12	7,01	6,59	7,76	8,13	8,37	8,14	7,96	9,80	7,94	8,18
mediale Dentin-Scheibe	10,53	7,30	7,99	8,63	11,21	11,58	9,34	10,46	10,48	10,04	9,75
apikale Dentin-Scheibe	11,27	11,25	11,23	13,00	16,83	15,31	11,63	13,96	11,16	13,92	12,96
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	10,64	8,52	8,60	9,80	12,06	11,75	9,70	10,79	10,48	10,63	10,30

Tabelle 30: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	9,64	6,69	6,29	7,41	7,75	7,98	7,76	7,59	9,34	7,56	7,80
mediale Dentin-Scheibe	10,04	6,96	7,62	8,23	10,69	11,04	8,90	9,96	9,99	9,53	9,30
apikale Dentin-Scheibe	10,75	10,74	10,72	12,40	16,06	14,59	11,08	13,29	10,64	13,25	12,35
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	10,14	8,13	8,21	9,35	11,50	11,20	9,25	10,28	9,99	10,11	9,82

Tabelle 31: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungsgruppe 3 (noch nicht in der Mundhöhle exponierte Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min

UG3 Proben-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW - relative enzymatische Aktivität je Schnittebene
koronale Dentin-Scheibe	8,99	6,25	5,88	6,92	7,23	7,44	7,24	7,07	8,70	7,04	7,27
mediale Dentin-Scheibe	9,37	6,50	7,11	7,68	9,97	10,27	8,30	9,28	9,31	8,83	8,66
apikale Dentin-Scheibe	10,02	10,02	10,00	11,56	14,98	13,59	10,33	12,37	9,92	12,32	11,51
MW - relative enzymatische Aktivität je Probe	9,46	7,59	7,66	8,72	10,73	10,43	8,62	9,57	9,31	9,40	9,15

8.4.5 Anhang Gliederungspunkt 4.7.2

Tabelle 32: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 30$ min

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)
Probe 1	10,25	13,07	13,10	11,00	8,21	14,13	14,79	12,05	16,91	10,64
Probe 2	8,26	10,52	12,54	10,65	11,17	10,20	21,21	10,84	13,00	13,55
Probe 3	10,29	9,13	10,92	13,07	7,86	9,66	22,73	10,24	14,15	13,04
Probe 4	8,74	8,04	13,06	12,17	10,30	13,12	18,79	7,80	16,32	14,11
Probe 5	11,90	15,39	12,49	10,62	9,39	8,72	16,07	10,91	24,43	15,43
MW - enzymatische Aktivität je Lagerungsmedium	9,9	11,2	12,4	11,5	9,4	11,2	18,7	10,4	17,0	13,4

Tabelle 33: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 60$ min

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)
Probe 1	9,78	12,47	12,51	10,49	7,84	13,47	14,11	11,49	16,14	10,16
Probe 2	7,81	10,04	11,96	10,16	10,65	9,71	20,25	10,35	12,40	12,92
Probe 3	9,67	8,71	10,39	12,47	7,52	9,15	21,69	9,78	13,50	12,44
Probe 4	8,23	7,67	12,43	11,61	9,83	12,51	17,94	7,44	15,56	13,46
Probe 5	11,32	14,67	11,92	10,12	8,95	8,31	15,34	10,40	23,30	14,68
MW - enzymatische Aktivität je Lagerungsmedium	9,4	10,7	11,8	11,0	9,0	10,6	17,9	9,9	16,2	12,7

Tabelle 34: Relative enzymatische Aktivitätswerte der jeweiligen Dentin-Scheiben der entsprechenden Proben und Schnittebenen der Untersuchungen der Lagerungsmedien (gelagerte Dentinscheiben und gelagerte komplette Zähne) in μU pro mg Dentin zum Mess-Zeitpunkt $t = 120$ min

Lagerungsmedium Lagerungsart Proben-Nummer	LM Wasser (gelagerte Scheiben)	LM Frost (gelagerte Scheiben)	LM Alkohol (gelagerte Scheiben)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Scheiben)	LM Wasser (gelagerte Zähne)	LM Frost (gelagerte Zähne)	LM Alkohol (gelagerte Zähne)	LM 0,1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)	LM 1 % Thymollsg. (gelagerte Zähne)
Probe 1	9,10	11,62	11,66	9,76	7,31	12,53	13,15	10,66	15,05	9,47
Probe 2	7,13	9,34	11,13	9,47	9,90	8,97	18,87	9,63	11,54	12,06
Probe 3	8,70	8,10	9,67	11,59	7,01	8,38	20,20	9,11	12,57	11,59
Probe 4	7,39	7,13	11,58	10,82	9,15	11,64	16,72	6,92	14,49	12,54
Probe 5	10,47	13,64	11,10	9,42	8,33	7,71	14,28	9,68	21,70	13,60
MW - enzymatische Aktivität je Lagerungsmedium	8,6	10,0	11,0	10,2	8,3	9,8	16,6	9,2	15,1	11,9

Erklärung gemäß § 7 Abs.1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt entnommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. Herr Prof. Dr. Matthias Hannig: | wissenschaftliche Betreuung |
| 2. Herr Prof. Dr. Stefan Rupf: | wissenschaftliche Betreuung und statistische Auswertung |
| 3. Frau Dr. Natalia Umanskaja: | wissenschaftliche labortechnische Betreuung |
| 4. Frau Ute Ulrich: | Fachübersetzung (englisch) der Zusammenfassung |

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Bretten, den 08.05.2016

Steffen Müller M.A., M.Sc